

Michael Ehbauer

RADIOIMMUNOLOGISCHE ACTH-BESTIMMUNG
Versuche zur direkten Bestimmung im Plasma
ohne Extraktion

1979

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR DR.MED. E. BUCHBORN

RADIOIMMUNOLOGISCHE ACTH-BESTIMMUNG
VERSUCHE ZUR DIREKTEN BESTIMMUNG IM PLASMA
OHNE EXTRAKTION

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Michael Ehbauer

aus
München

1978



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof.Dr.med.P.C.Scriba
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.med.E.Buchborn
Dekan:	Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.3.1979

Meiner lieben Frau

Meine Frau hat mir, wie ich es mir wünsche, die
Darstellung des Tages:

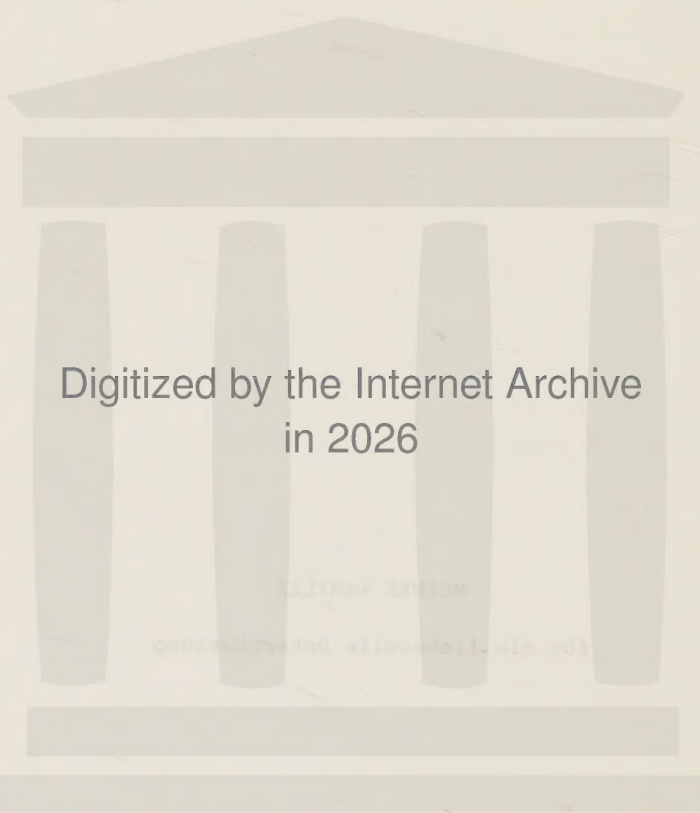
Meine Frau hat mir, wie ich es mir wünsche, die
Darstellung des Tages:

Meine Frau hat mir, wie ich es mir wünsche, die
Darstellung des Tages:

Meine Frau hat mir, wie ich es mir wünsche, die
Darstellung des Tages:

MEINER FAMILIE

für die liebevolle Unterstützung



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Danken möchte ich

Herrn Professor Dr. med. P. C. Scriba für die
Überlassung des Themas,

Herrn Dr. med. O. A. Müller für seine fachliche
und menschliche Unterstützung während der gesamten
Dauer dieser Dissertation,

Herrn Dr. rer.nat., Dr.med.habil.F.Erhardt für die
Hilfe bei Markierungsproblemen,

allen anderen Laborkolleginnen und Kollegen dieser
Abteilung für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre,

Herrn L. Bestler für die Anfertigung der Zeichnun-
gen und Frau F. Haag für photographische Arbeiten.

1.1.1.1.	Einleitung	1
1.1.1.2.	Ziele und Aufgabenstellung	1
1.1.1.3.	Methoden	12
1.1.1.4.	Ergebnisse	12
1.1.1.5.	Diskussion	11
1.1.1.6.	Fazit	11
1.1.1.7.	Quellenverzeichnis	11
1.1.1.8.	Tabellenverzeichnis	11
1.1.1.9.	Abbildungsverzeichnis	11
1.1.1.10.	Lebenslauf	11
1.1.1.11.	Danksagung	11
1.1.1.12.	Zusammenfassung	11
1.1.1.13.	Abstract	11
1.1.1.14.	Resümee	11
1.1.1.15.	Summary	11
1.1.1.16.	Conclusions	11
1.1.1.17.	References	11
1.1.1.18.	Tables	11
1.1.1.19.	Figures	11
1.1.1.20.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.21.	Acknowledgements	11
1.1.1.22.	Summary	11
1.1.1.23.	Abstract	11
1.1.1.24.	Resümee	11
1.1.1.25.	Summary	11
1.1.1.26.	Conclusions	11
1.1.1.27.	References	11
1.1.1.28.	Tables	11
1.1.1.29.	Figures	11
1.1.1.30.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.31.	Acknowledgements	11
1.1.1.32.	Summary	11
1.1.1.33.	Abstract	11
1.1.1.34.	Resümee	11
1.1.1.35.	Summary	11
1.1.1.36.	Conclusions	11
1.1.1.37.	References	11
1.1.1.38.	Tables	11
1.1.1.39.	Figures	11
1.1.1.40.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.41.	Acknowledgements	11
1.1.1.42.	Summary	11
1.1.1.43.	Abstract	11
1.1.1.44.	Resümee	11
1.1.1.45.	Summary	11
1.1.1.46.	Conclusions	11
1.1.1.47.	References	11
1.1.1.48.	Tables	11
1.1.1.49.	Figures	11
1.1.1.50.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.51.	Acknowledgements	11
1.1.1.52.	Summary	11
1.1.1.53.	Abstract	11
1.1.1.54.	Resümee	11
1.1.1.55.	Summary	11
1.1.1.56.	Conclusions	11
1.1.1.57.	References	11
1.1.1.58.	Tables	11
1.1.1.59.	Figures	11
1.1.1.60.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.61.	Acknowledgements	11
1.1.1.62.	Summary	11
1.1.1.63.	Abstract	11
1.1.1.64.	Resümee	11
1.1.1.65.	Summary	11
1.1.1.66.	Conclusions	11
1.1.1.67.	References	11
1.1.1.68.	Tables	11
1.1.1.69.	Figures	11
1.1.1.70.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.71.	Acknowledgements	11
1.1.1.72.	Summary	11
1.1.1.73.	Abstract	11
1.1.1.74.	Resümee	11
1.1.1.75.	Summary	11
1.1.1.76.	Conclusions	11
1.1.1.77.	References	11
1.1.1.78.	Tables	11
1.1.1.79.	Figures	11
1.1.1.80.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.81.	Acknowledgements	11
1.1.1.82.	Summary	11
1.1.1.83.	Abstract	11
1.1.1.84.	Resümee	11
1.1.1.85.	Summary	11
1.1.1.86.	Conclusions	11
1.1.1.87.	References	11
1.1.1.88.	Tables	11
1.1.1.89.	Figures	11
1.1.1.90.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.91.	Acknowledgements	11
1.1.1.92.	Summary	11
1.1.1.93.	Abstract	11
1.1.1.94.	Resümee	11
1.1.1.95.	Summary	11
1.1.1.96.	Conclusions	11
1.1.1.97.	References	11
1.1.1.98.	Tables	11
1.1.1.99.	Figures	11
1.1.1.100.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.101.	Acknowledgements	11
1.1.1.102.	Summary	11
1.1.1.103.	Abstract	11
1.1.1.104.	Resümee	11
1.1.1.105.	Summary	11
1.1.1.106.	Conclusions	11
1.1.1.107.	References	11
1.1.1.108.	Tables	11
1.1.1.109.	Figures	11
1.1.1.110.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.111.	Acknowledgements	11
1.1.1.112.	Summary	11
1.1.1.113.	Abstract	11
1.1.1.114.	Resümee	11
1.1.1.115.	Summary	11
1.1.1.116.	Conclusions	11
1.1.1.117.	References	11
1.1.1.118.	Tables	11
1.1.1.119.	Figures	11
1.1.1.120.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.121.	Acknowledgements	11
1.1.1.122.	Summary	11
1.1.1.123.	Abstract	11
1.1.1.124.	Resümee	11
1.1.1.125.	Summary	11
1.1.1.126.	Conclusions	11
1.1.1.127.	References	11
1.1.1.128.	Tables	11
1.1.1.129.	Figures	11
1.1.1.130.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.131.	Acknowledgements	11
1.1.1.132.	Summary	11
1.1.1.133.	Abstract	11
1.1.1.134.	Resümee	11
1.1.1.135.	Summary	11
1.1.1.136.	Conclusions	11
1.1.1.137.	References	11
1.1.1.138.	Tables	11
1.1.1.139.	Figures	11
1.1.1.140.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.141.	Acknowledgements	11
1.1.1.142.	Summary	11
1.1.1.143.	Abstract	11
1.1.1.144.	Resümee	11
1.1.1.145.	Summary	11
1.1.1.146.	Conclusions	11
1.1.1.147.	References	11
1.1.1.148.	Tables	11
1.1.1.149.	Figures	11
1.1.1.150.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.151.	Acknowledgements	11
1.1.1.152.	Summary	11
1.1.1.153.	Abstract	11
1.1.1.154.	Resümee	11
1.1.1.155.	Summary	11
1.1.1.156.	Conclusions	11
1.1.1.157.	References	11
1.1.1.158.	Tables	11
1.1.1.159.	Figures	11
1.1.1.160.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.161.	Acknowledgements	11
1.1.1.162.	Summary	11
1.1.1.163.	Abstract	11
1.1.1.164.	Resümee	11
1.1.1.165.	Summary	11
1.1.1.166.	Conclusions	11
1.1.1.167.	References	11
1.1.1.168.	Tables	11
1.1.1.169.	Figures	11
1.1.1.170.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.171.	Acknowledgements	11
1.1.1.172.	Summary	11
1.1.1.173.	Abstract	11
1.1.1.174.	Resümee	11
1.1.1.175.	Summary	11
1.1.1.176.	Conclusions	11
1.1.1.177.	References	11
1.1.1.178.	Tables	11
1.1.1.179.	Figures	11
1.1.1.180.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.181.	Acknowledgements	11
1.1.1.182.	Summary	11
1.1.1.183.	Abstract	11
1.1.1.184.	Resümee	11
1.1.1.185.	Summary	11
1.1.1.186.	Conclusions	11
1.1.1.187.	References	11
1.1.1.188.	Tables	11
1.1.1.189.	Figures	11
1.1.1.190.	Curriculum Vitae	11
1.1.1.191.	Acknowledgements	11
1.1.1.192.	Summary	11
1.1.1.193.	Abstract	11
1.1.1.194.	Resümee	11
1.1.1.195.	Summary	11
1.1.1.196.	Conclusions	11
1.1.1.197.	References	11
1.1.1.198.	Tables	11
1.1.1.199.	Figures	11
1.1.1.200.	Curriculum Vitae	11

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. METHODEN UND VORVERSUCHE</u>	5
2.1. Prinzip	5
2.2. Blutentnahme	6
2.3. Präparate und Lösungsmittel	7
2.3.1. ACTH-Standardpräparationen	7
2.3.2. Puffer und Lösungsmittel	9
2.3.2.1. Puffer A	9
2.3.2.2. Puffer B	10
2.3.2.3. Puffer C	10
2.3.2.4. Puffer D	11
2.3.2.5. Lösungsmittel für AK 1	11
2.3.2.6. ACTH-freies Serum	11
2.4. Der ACTH-spezifische Antikörper	12
2.4.1. Antiserum "Ulm"	12
2.4.2. Antiserum "Marseille"	13
2.4.3. Eigene Antiseren	13
2.4.3.1. Herstellung	13
2.4.3.2. Titeruntersuchung	15
2.4.3.3. Verdrängung	19
2.5. Tracer	20
2.5.1. Markierung	20
2.5.2. Tracerreinigung	22
2.5.3. Verdünnung des Tracers und spezifische Aktivität	23
2.5.4. Reinheitsprüfung des Tracers	25
2.5.5. Bindungsversuch	29

	<u>Seite</u>
2.6.	Bound-free-Trennung 30
2.6.1.	Trennung mit Talk 31
2.6.2.	Trennung mit Charcoal 32
2.6.3.	Trennung mit 2. Antikörper 32
2.6.4.	Vergleich mit verschiedenen Trennungsmethoden 34
2.6.4.1.	Die Streuung der Dreifachwerte 34
2.6.4.2.	Höhe der erreichten Bindungs- werte an den 1. Antikörper 35
2.6.4.3.	Untere Nachweisgrenze 35
2.6.4.4.	Die unspezifische Bindung 37
2.6.5.	Folgerungen 38
2.7.	Inkubationsansatz 39
2.7.1.	Volumina 39
2.7.2.	Inkubationszeiten 40
2.7.3.	Pipettier- und Inkubationsschema 42
2.8.	Inkubationstemperatur 44
2.9.	Aktivitätsmessung und Auswertung 44
<u>3.</u>	<u>ERGEBNISSE</u> 45
3.1.	Empfindlichkeit 45
3.1.1.	Vorinkubation 45
3.1.2.	Standard und Antikörper 47
3.2.	Richtigkeit 50
3.2.1.	Standardkurven in Puffer und Serum 50
3.2.2.	Serum-Verdünnung 53
3.3.	Meßergebnisse 56
3.3.1.	Pathologisch erhöhte Serumwerte 56

	<u>Seite</u>
3.3.2. Stimulationstest	56
3.3.3. Normalkollektiv	57
<u>4. DISKUSSION</u>	60
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	66
<u>6. LITERATUR</u>	68
<u>7. LEBENSLAUF</u>	77

1. EINLEITUNG

Seit mehr als 15 Jahren wurde das Prinzip der radioimmunologischen Bestimmung von Hormonen mit zunehmendem Erfolg in der endokrinologischen Diagnostik eingesetzt. Sowohl im wissenschaftlichen, als auch im klinischen Bereich gewann diese Methode immer mehr an Bedeutung.

BERSON und YALOW glückte es als ersten, ein Hormon - nämlich das Insulin - radioimmunologisch zu bestimmen (57). Danach gelang es, andere Hormone, insbesondere Peptidhormone, nach diesem Methodenprinzip zu bestimmen, wobei die dabei auftretenden Schwierigkeiten von Hormon zu Hormon verschieden waren.

Sehr große Schwierigkeiten traten beim - wiederum erstmals von BERSON und YALOW entwickelten - ACTH-RIA (3) auf, weswegen die radioimmunologische Bestimmung von ACTH auch heute noch keinesfalls routinemäßig durchgeführt werden kann.

Die Hauptgründe hierfür kann man folgendermaßen zusammenfassen: ACTH ist, verglichen mit anderen Peptidhormonen, relativ klein und besitzt bei einer Kettenlänge von 39 Aminosäuren ein Molekulargewicht von nur ca. 4500 (9, 43, 48). Dieses geringe Molekulargewicht zusammen mit der Tatsache, daß ACTH keine intramolekularen Disulfidbrücken besitzt, sind für die nur sehr schwache antigene Wirkung des Hormons verantwortlich

(1, 48). Zu den ungünstigen molekularen Verhältnissen tritt auch noch ein physiologischer Effekt des ACTH, welcher ebenfalls die Bildung von Antikörpern gegen appliziertes ACTH beeinträchtigt. Über die Stimulation der Cortisolsekretion aus der Nebennierenrinde bei ACTH-Verabreichung wird nämlich infolge der thymo-lymphatisch-involutiven Wirkung des Cortisols die Antikörperbildung gegen das zirkulierende ACTH erheblich vermindert bzw. verhindert. Die Gewinnung eines möglichst selektiven Antiserums mit hoher Affinitätskonstante, was eine der wichtigsten Voraussetzungen eines RIAs darstellt, ist somit erschwert.

Weiterhin findet man ACTH im Blut nur in äußerst geringen Konzentrationen, die bei Normalpersonen - je nach Bestimmungsmethode - zwischen 20 pg/ml und höchstens 150 pg/ml liegen (3, 18, 44, 55). Dieses Hormon liegt also in etwa 25 - 75 mal geringerer Konzentration im Plasma vor, als etwa Insulin oder Wachstumshormon, was erheblich höhere Anforderungen an die Empfindlichkeit des Assays stellt.

Zu erwähnen ist auch, daß ACTH im Plasma äußerst schnell von proteolytischen Enzymen abgebaut wird. Nach unterschiedlichen Ergebnissen verschiedener Autoren dürfte die biologische Halbwertszeit des endogenen Hormons höchstens zwischen 25 und 40 Minuten liegen (3, 9, 17, 36, 52).

Seit den späten 60er Jahren wuchs die Erkenntnis, daß viele, wenn nicht sogar alle Peptidhormone in mehr als nur einer einzigen Form im Plasma, in endokrinen Organen oder anderen Gewebsextrakten vorkommen (4, 14, 56). So wurden z. B. neben dem 1 - 39 ACTH-Peptid in Gewebsextrakten Moleküle mit höherem Molekulargewicht gefunden, das sogenannte "Big-ACTH" bzw. "Big-Big-ACTH". Diese "Big-ACTH"-Peptide sind radioimmunologisch nicht unbedingt vom 39er Peptid unterscheidbar, besitzen jedoch fast keine biologische Aktivität. Sie "konvertieren" durch tryptische Verdauung unter anderem zu einem 39-Peptid, welches eine seiner immunologischen Aktivität entsprechende biologische Aktivität aufweist. Es sind also diese "Big-ACTH"-Peptide möglicherweise Vorläuferformen des bekannten, biologisch wirksamen 39-Peptides. Ein spezifisches "Converting-Enzyme" wird in diesem Zusammenhang postuliert. "Big-ACTH" stelle zum Beispiel bei Patienten mit ektopischer ACTH-Produktion (mit oder ohne klinischem Cushing-Syndrom) die dominierende Hormonfraktion, beim M. Addison hingegen sei das 39-Peptid die einzig meßbare Fraktion (4, 14, 56).

Weiterhin spricht man von immunologisch aktiven, biologisch inaktiven und von immunologisch inaktiven, biologisch aktiven Fragmenten, die als Störfaktoren bei der radioimmunologischen Bestimmung auftreten könnten (3, 4, 44, 56).

Andere Autoren (13, 22, 37, 49, 47, 60) nahmen aufgrund verschiedener Untersuchungsergebnisse die Existenz eines sogenannten "Protein-binding-factor" im Plasma an, der eine direkte Bestimmung des Hormons im Plasma grundsätzlich unmöglich machen soll. Die Folge war die Entwicklung verschiedener Trennungsmethoden, etwa Adsorption über Kieselsäure (10), Extraktion mit Aceton-Essigsäure (8), Fuller-Erde (20, 21), Quiso (47), mit denen das ACTH vor seiner eigentlichen Bestimmung aus dem Serum extrahiert werden sollte, was jedoch in den allermeisten Fällen mit großen Schwierigkeiten verbunden war und oft keine befriedigenden Ergebnisse brachte.

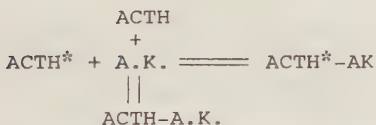
Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer radioimmunologischen ACTH-Bestimmungsmethode. Dabei wurde versucht, eigene, empfindliche ACTH-Antiseren zu gewinnen. Es wurde als "Bound-Free"-Trennungsmethode eine Doppelantikörpermethode gewählt, um eine eventuelle spätere Automatisierung nach dem Prinzip der Doppelantikörpermethoden zu ermöglichen (27). Zum anderen wurde der Versuch unternommen, die aufwendige und oft nicht sehr erfolgreiche Extraktion von ACTH aus dem Serum bzw. Plasma zu umgehen (3, 44), nachdem uns ein sehr empfindliches Antiserum zur Verfügung gestellt wurde, mit dem eine direkte Messung des ACTH im Serum beschrieben worden war (44).

2. METHODEN UND VORVERSUCHE

2.1. Prinzip

Man bedient sich bei diesem Methodenprinzip einer Antigen-Antikörperreaktion, wobei das ACTH die Rolle des Antigens spielt.

Dabei konkurrieren das unmarkierte Hormon und das in konstanten Mengen zugesetzte radioaktiv markierte Hormon als "Tracer" in einer kompetitiven Verdrängungsreaktion um den vorhandenen Antikörper:



Wie das obige Schema verdeutlichen soll, entstehen Bindungskomplexe zwischen Antikörper und markiertem ACTH, Bindungskomplexe zwischen Antikörper und unmarkiertem, kaltem ACTH, sowie überschüssiges freies Hormon.

Je mehr kaltes Hormon vorhanden ist, desto weniger Tracer ist an den Antikörper gebunden und desto mehr Tracer liegt als freies Hormon vor. Diese Beziehung ist streng konzentrationsabhängig, so daß durch eine Trennung des antikörpergebundenen Anteils (B="bound")

vom freien Hormon (F="free") - wofür mehrere Verfahren zur Verfügung stehen (siehe auch 2.6.) - und anschließende Messung der Radioaktivität von "B" oder "F" eine Eichkurve erstellt werden kann.

2.2. Blutentnahme

ACTH wird im Plasma äußerst schnell - insbesondere durch Proteasen - inaktiviert. Nach Suppression der ACTH-Sekretion durch z. B. Dexamethason oder Cortisol, verschwindet das Hormon mit einer Halbwertszeit von 25 bis 40 Minuten (3, 9, 17, 36, 52) aus dem Blut. Exogenes ACTH soll sogar nur eine Halbwertszeit von 5 Minuten und weniger haben (15, 30, 38, 39).

Um den durch Inaktivierung entstehenden Verlust an Plasma-ACTH möglichst gering zu halten, erfolgt die Blutentnahme unter besonderen Bedingungen:

- a) Blutentnahme aus der Vena cubitalis durch einfaches Abtropfen lassen in die Auffanggefäße.
- b) Als Auffanggefäße EDTA-beschichtete 10 ml-Poly-styrolgefäße (geringere Wandadsorption als an Glas); EDTA-Beschichtung schützt das ACTH vor der Inaktivierung im Plasma wesentlich besser als Heparin (32, 46, 54) und wurde deshalb diesem vorgezogen.
- c) Kühlung der Blutentnahmegefäße im Eisbad während des Transports ins Labor, um eine rasche Abkühlung des frisch entnommenen Blutes auf ca. 4°C zu erreichen.

- d) Bereits vor der Blutentnahme Einbringen von 200 μ l aus einer auf 4°C gekühlten 5 ml-Trasylol-ampulle, um eine Konzentration von 400 KIU/ml Blut und somit einen Schutz vor Zerstörung des Peptidhormons durch proteolytische Fermente zu erreichen (5, 29, 37, 40).
- e) Sofortiges Zentrifugieren der abgekühlten Blutproben bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von ca. 3000 U/min (= ca. 1500 g) und Einfrieren der dekantierten Plasmen bei -80°C.

2.3. Präparate und Lösungsmittel

2.3.1. ACTH-Standardpräparationen*

Synthetisches Corticotropin (β_{1-23})-trikosipeptid Acetropan-S^R, Fa. Hoechst, Frankfurt;

h-ACTH₁₋₃₉, human, synthetisch, Fa. Ciba, Basel;

Schweine-ACTH₁₋₃₉ aus Hypophysen isoliert, Dr. Aaron B. Lerner.

Es sei kurz auf die Probleme der Standardisierung hingewiesen: Zwischen den einzelnen ACTH-Präparationen

*) An dieser Stelle sei sowohl den Firmen Hoechst (Frankfurt) und Ciba (Basel), als auch Herrn Dr. Lerner, New Haven, USA, für die freundliche Überlassung ihrer Präparate gedankt.

gibt es erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer biologischen Aktivität, wobei unter anderem auch die jeweilige biologische Bestimmungsmethode eine Rolle spielt. Es finden sich auch Unterschiede im Bindungsverhalten gegenüber dem ACTH-spezifischen Antikörper, was bisweilen auch für einzelne unterschiedliche Chargen derselben Firma gilt. Das heißt, daß sich bei jedem Wechsel der Charge oder der Firmenpräparation der Normalbereich eines Laboratoriums ändern kann; abgesehen davon, daß sich verschiedene Laboratorien untereinander bezüglich ihres Normalbereichs unterscheiden, und somit Meßergebnisse nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

Alle oben aufgeführten ACTH-Präparate wurden lyophilisiert bei -20°C aufbewahrt. Soweit Lösungen dieser Präparate hergestellt wurden, bewahrten wir diese in von uns eigens dafür silikonisierten Glasgefäßen bei -80°C auf.

2.3.2. Puffer und Lösungsmittel

2.3.2.1.

0,01 M Veronal-Puffer pH 8,6 = Puffer A
400 KIU/ml Trasylol
0,04 % Mercaptoaethanol
1 % Rinderalbumin
d. h:
4 Amp. Trasylol je 5 ml à 100.000 KIU/ml
0,4 ml Mercaptoaethanol (Merck)
10 g Pentex^R (Fa. Carl Roth, Karlsruhe)
ad 1000,0 ml aqua dest.

Dieser, im folgenden Text als Puffer A bezeichnete Puffer wurde verwendet:

Zur Verdünnung der ACTH-Stammlösung für die Erstellung der Standardkurve;

zur Verdünnung der Antikörperlösungen (sowohl für Antikörper 1 als auch für Antikörper 2).

Trasylol dient als Schutz gegen proteolytische Enzyme, Mercaptoaethanol gegen oxydative Zerstörung. Albumin gegen die Adsorption des Peptids an Glaswände, Pipettenspitzen und ähnliches.

2.3.2.2.

0,0125 M Phosphat-Puffer pH 7,4 = Puffer B

400 KIU/ml Trasylol

0,04 % Mercaptoaethanol

4 % Rinderalbumin

d. h.:

2,46 g Natriumdihydrogenphosphat

4 Amp. Trasylol

0,4 ml Mercaptoaethanol

40 g Pentex

ad 1000,0 ml aqua dest. und mit Natronlauge titriert.

Dieser, im folgenden Text als Puffer B bezeichnete

Puffer diene zur Verdünnung des Tracers auf die gewünschte Aktivität.

2.3.2.3.

0,05 M Phosphatpuffer pH 7,4 = Puffer C

0,9 % Natriumchlorid

0,02 % Natriumnitrat

d. h.:

8,197 g Natriumdihydrogenphosphat

9,0 g Natriumchlorid

0,2 g Natriumnitrat

ad 1000,0 ml aqua dest. und mit Natronlauge titriert.

Dieser im folgenden Text als Puffer C bezeichnete

Puffer wurde zum Lösen des lyophilisierten ACTH, sowie von Chloramin-T und Natriummetabisulfit für die Markierung (s.u.) verwendet.

2.3.2.4.

0,4 M Phosphat-Puffer pH 7,4 = Puffer D

d. h.:

65,6 g Natriumdihydrogenphosphat

ad 1000,0 ml aqua dest. und der Natronlauge titriert.

Zur Verdünnung und Neutralisierung des ^{125}J bei der Markierung.

2.3.2.5.

Lösungsmittel für den lyophilisierten Antikörper 1

0,02 % Natriumacid

0,9 % Natriumchlorid

1 % Rinderalbumin

d. h.:

0,2 g Natriumacid

9,0 g Natriumchlorid

10,0 g Pentex^R

ad 1000,0 ml aqua dest.

2.3.2.6. ACTH-freies Serum

Die Reste der bei Routinebestimmungen in der klinischen Chemie angefallenen Seren wurden zu diesem Zweck gemischt und bei 4°C über Nacht stehen gelassen.

Infolge der auch im Serum aktiven proteolytischen Enzyme des Blutes war dieses Serum sicher ACTH-frei.

Außerdem wurde ACTH-freies Serum von Mitarbeitern gewonnen, die sich einer Dexamethason-Suppression in Form einer zweitägigen regelmäßigen oralen Einnahme von 2 mg Fortecortin^R alle 6 Stunden unterzogen.

Alle aufgeführten Puffer und Lösungsmittel wurden bei 4°C aufbewahrt, das ACTH-freie Serum lagerten wir bei -20°C .

2.4. Der ACTH-spezifische Antikörper*

2.4.1. Antiserum "Ulm"

Die endokrinologische Abteilung der Medizinischen Klinik der Universität in Ulm stellte uns einen Antikörper zur Verfügung, der von einem Kaninchen stammt und mit extrahiertem Schweine-ACTH erzeugt worden war ("K 11", 16) zur Verfügung. Es standen uns 0,2393 g lyophilisierter Antikörper zur Verfügung, was ca. 2 ml Antiserum entsprechen sollte (persönliche Mitteilung Dr. FEHM, Ulm). $1/20$ davon = 0,0119 g ad 10 ml bedeutet eine Verdünnung auf $1/100$, ad 50 ml bedeutet $1/500$, was der Konzentration unserer Stammlösung entsprach. Nach Bedarf stellten wir daraus eine Arbeitsverdünnung in der Konzentration $1/2000$ her.

Als Verdünnungsmittel der einzelnen Schritte diente Puffer A.

Der lyophilisierte Antikörper wurde in der Kühltruhe bei -20°C aufbewahrt, alle Verdünnungen im Kühlraum bei 4°C .

*) Wir möchten an dieser Stelle Herrn Dr. H.L.FEHM und Dr. K. H. VOIGT (Ulm) sowie Prof. DEPIEDS (Marseille) besonders herzlich für die Überlassung der Antiseren danken.

2.4.2. Antiserum "Marseille"

Einen weiteren Antikörper konnten wir aus Marseille von der Arbeitsgruppe DEPIEDS und OLIVIER erhalten. Dieser Antikörper wurde bei Kaninchen mit an Rinderalbumin copolimerisiertem Schweine-ACTH erzeugt (44).

Wir erhielten etwa 1 ml Lösung, die auf 2 Teile physiologischer Natriumchloridlösung ein Teil Antiserum enthielt. Die weitere Verdünnung erfolgte jeweils mit Puffer A (wie schon beim Ulmer Antiserum).

Aufbewahrt wurde das Antiserum (Empfehlung von Prof. DEPIEDS) sowie seine Verdünnungen bei 4°C.

Es muß dabei erwähnt werden, daß wir dieses Antiserum wegen Postverzögerungen erst erhielten, nachdem es schon etwa fünf Tage lang relativ warmen Außentemperaturen ausgesetzt war, was erklären könnte, daß wir dieses Serum mit einem ca. 1 Zehnerpotenz niedrigeren Titer verwenden mußten, als wir dies nach den entsprechenden Veröffentlichungen erwarten konnten (44).

2.4.3. Eigene Antiseren

2.4.3.1. Herstellung

Wir injizierten, wie in der Literatur für andere Hormone vorgeschlagen (34, 55), 12 Kaninchen subcutan an 30 verschiedenen Stellen über den rasierten Rücken verteilt Zink-Corticotropin (Cortropin S Depot^R, Fa. Organon) als Antigen. Die totale Menge zur Immunisie-

rung eines Tieres betrug etwa 6 E Antigen in kompletten Freund's Adjuvans.

Pro Injektion 0,1 ml Impflösung ergibt bei 30 Injektionen pro Tier und einer Stückzahl von 12 Kaninchen 36 ml Impflösung.

2 ml Cortropin S Depot^R = 2,24 mg β^{1-24} Corticotropinhexaacetat, 16 ml Freund's Adjuvans (6 ml komplett, 10 ml inkomplett) und 20 ml physiologischer Kochsalzlösung ergaben diese Impfmulsion.

Um eine möglichst feine und stabile Emulsion zu erhalten, wurden zwei Einmalspritzen mit einem kleinen PVC-Schlauch verbunden, so daß man die Emulsion durch Hin- und Herpressen vermischen konnte. Nach etwa 20-maligem Pressen war die Emulsion verwendungsfähig.

β^{1-24} Corticotropin ist ein synthetisch hergestelltes Polypeptid, das aus den ersten 24 N-terminalen Aminosäuren des menschlichen ACTH besteht. Um eine Depot-Wirkung zu erzielen, ist der Pufferlösung Zink beige-setzt.

Das komplette Freund'sche Adjuvans enthält 1,5 ml Mannit-Monooleat, 8,5 ml Draceol (ein leichtes Mineralöl) und 10 mg Mycobacterium Tuberculosis (human) hitzeabgetötet und getrocknet, welches beim inkompletten Adjuvans fehlt.

Das Freund'sche Adjuvans wird im Tierversuch zur Verstärkung der immunisierenden Wirkung des eingesetzten Antigens verwendet.

Um die Reizantwort noch zusätzlich zu verstärken, injizierten wir jedem Kaninchen 0,25 ml Pertussis-Adsorbat-Impfstoff der Firma Behring intramuskulär in die Hinterpfote.

Im Abstand von jeweils einem Monat wurde bei jedem Tier eine "Booster"-Injektion durchgeführt, nachdem man vorher eine Blutprobe aus einer Ohrvene entnommen hatte, um den bisher erreichten Antikörpertiter zu überprüfen.

Bei dieser "Booster"-Injektion wurde jedem Kaninchen intramuskulär in die Hinterpfote 0,5 ml einer gleichen Emulsion appliziert, wie sie schon bei der Grundimmunisierung verwendet worden war.

Von unseren zwölf Versuchstieren starben zwei noch vor, ein drittes nach der ersten "Boosterung".

2.4.3.2. Titeruntersuchung

Aus den frisch entnommenen Kaninchen-Blutproben wurden mit Puffer A sofort Verdünnungen von 1/100, 1/1000 und 1/10.000 in Eppendorf-Reaktionsgefäßen hergestellt und nach dem später erläuterten Pipettierschema (2.7.3.) radioaktives ACTH zugegeben. Nach Zusatz des Antikörpers II (siehe auch 2.6.3.), wurde der Ansatz 16 Stunden bei 4°C inkubiert und dann mit einer g-Zahl von ca. 1500 zentrifugiert. Nach Absaugen zählten wir die übriggebliebene "B"-Fraktion im Tracerlab.

Die Seren der Kaninchen Nr. 5, 8, 9, 11 und 12 zeigten dabei ein recht gutes Bindungsvermögen (Tab. 1). Es war also gelungen, einige Hasen zur Antikörperbildung gegen injiziertes ACTH zu veranlassen. Bei allen Tieren zeigte sich übrigens bei der Serumverdünnung 1/1000 die größte Bindungsfähigkeit.

Tab. 1: Verlauf der Tracerbindung (in % B/T)
einzelner "guter" ACTH-Antiseren
(Serumverdünnung 1 : 1000)

Tier	nach 1. Boosterung B/T in %	nach 2. Boosterung B/T in %
K ₅	1,8	18,9
K ₈	5,3	44,2
K ₉	4,4	21,3
K ₁₁	5,0	37,4
K ₁₂	7,4	24,0

Eine dritte Boosterung brachte keine nennenswerte Erhöhung der Bindung. Von weiteren Boosterungen sahen wir wegen Ergebnissen unter 2.4.3.3. ab, da eine Verwendbarkeit für den Radioimmunoassay nicht zu erwarten war.

Tab. 2:

Tier	Serumverdünnung	CpM (B-N)	$\frac{P}{T}$ in %
Nr. 1 +			
Nr. 2 +			
Nr. 3	1/100	621	3,1
		610	3,0
	1/1000	1393	6,9
		1302	6,5
	1/10.000	649	3,2
		710	3,5
Nr. 4 +			
Nr. 5	1/100	637	3,1
		604	3,0
	1/1000	3549	17,7
		4023	20,1
	1/10.000	1282	6,4
		1361	6,8
Nr. 6	1/100	512	2,5
		604	3,0
	1/1000	1011	5,0
		960	4,8
	1/10.000	586	2,9
		648	3,2
Nr. 7	1/100	470	2,4
		479	2,4
	1/1000	983	4,9
		837	4,1
	1/10.000	600	3,0
		598	2,9
Nr. 8	1/100	945	4,7
		981	4,9
	1/1000	8683	43,0
		9093	45,4
	1/10.000	2769	13,8
		2627	13,1

+) gestorben vor der 1. Boosterung

Tab. 2 (Fortsetzung)

Tier	Serumverdünnung	CpM (B-N)	$\frac{\%B}{T}$ in %
Nr. 9	1/100	690	3,4
		624	3,1
	1/1000	4293	21,4
		4248	21,2
	1/10.000	1115	5,5
		1058	5,2
Nr. 10	1/100	530	2,1
		417	2,0
	1/1000	997	4,9
		888	4,4
	1/10.000	623	3,1
		680	3,4
Nr. 11	1/100	952	4,7
		1113	5,5
	1/1000	7431	37,1
		7561	37,8
	1/10.000	1828	9,1
		1903	9,5
Nr. 12	1/100	754	3,7
		675	3,3
	1/1000	4868	24,3
		4745	23,7
	1/10.000	1366	6,8
		1469	7,3

2.4.3.3. Verdrängung

Um eine Standardkurve mit diesen selbst gewonnenen Antikörpern erstellen zu können, wäre nicht nur ein ausreichendes Bindungsvermögen des AK an ACTH, sondern auch ein flexibel reagierendes Austauschspiel zwischen "kaltem" und "heißem" ACTH in der Bindung an den AK bei unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen erforderlich gewesen.

Deswegen führten wir mit den fünf oben beschriebenen eigenen Antiseren Verdrängungsversuche durch. Dem Inkubationsansatz wurden also definierte Mengen unmarkierten "kalten" ACTH's zugesetzt (in diesem Falle 300 µl einer Lösung von 10 ng/ml ACTH).

Leider zeigte sich aber bei diesen Versuchen trotz Zusatzes von "kaltem" ACTH nicht die eigentlich zu erwartende Verminderung der gemessenen "B"-Fraktion, so daß unsere Antikörper wegen ihrer hohen ACTH-Affinität für Bindungsversuche dienlich waren (z. B. bei frisch markierten Tracern), oder eventuell für histochemische Untersuchungen geeignet wären, jedoch keine Standardkurven erhoffen lassen konnten.

2.5. Tracer

2.5.1. Markierung

Im wesentlichen markierten wir nach der für das Wachstumshormon erarbeiteten Vorlage von HUNTER und GREENWOOD (16, 19), welche in Modifikationen bereits mehrfach für das ACTH angewandt wurde (3, 46).

Wegen der längeren Halbwertszeit ($^{125}\text{J} = 60 \text{ d}$, $^{131}\text{J} = 8,09 \text{ d}$), weil ^{125}J praktisch frei von anderen Isotopen ist und weil die maximale Zähleffizienz für ^{125}J dreimal so groß ist wie diejenige des ^{131}J (3), verwendeten wir zur Markierung das Isotop ^{125}J der Firma Behring, Marburg. Die spezifische Aktivität beträgt 8 - 15 mCi $^{125}\text{J}/\text{mg}$ Jod. Die Konzentration ist größer als 100 mCi $^{125}\text{J}/\text{ml}$. Die radiochemische Reinheit des Nuklides, d. h. der Jodidanteil beträgt mehr als 99 % und weniger als 1 % der Gesamtaktivität besteht aus ^{126}J (Angaben des Herstellers). Die maximale Aktivitätsmenge des Isotops wurde vom Hersteller genau auf ein gewünschtes Datum eingestellt.

Um ACTH markieren zu können, d. h. das Hormon mit dem radioaktiven ^{125}J zu jodieren, muß letzteres, das ja als relativ reaktionsträges Jodid vorliegt, in einer Oxidationsreaktion in das wesentlich reaktionsfreudigere elementare ^{125}J umgewandelt werden. Die nun ablaufende Markierungsreaktion stoppt man mit Hilfe eines Reduktionsmittels, das restliches elementares ^{125}J

wieder zum reaktionsträgen Jodid verwandelt. Als Oxidationsmittel diente Chloramin T, als Reduktionsmittel Natriummetabisulfat.

1 mCi ^{125}J (pH 8 nach Angabe des Herstellers) wird in 20 μl Puffer D (pH 7,4) gelöst. Wir markierten anfangs 2 μg ACTH, später - um eine höhere spezifische Aktivität zu erreichen - 0,5 μg ACTH. Gelöst waren diese Mengen immer in 5 μl Puffer C.

Unter permanentem Schütteln mit Hilfe eines Whirlmix Vortex Genie (Fa. Scientific Instruments Inc. Springfield/Mass.) setzten wir mit 10 μl einer Chloramin T-Lösung (25 mg ad 8 ml Puffer C) die Markierungsreaktion in Gang und stoppten sie nach 3 - 5 sec mit 20 μl einer Natriummetabisulfit-Lösung (25 mg ad 8 ml Puffer C).

Beide oben genannten Lösungen wurden kurz vor der Markierung hergestellt, die Chloramin T-Lösung wegen ihrer enormen Lichtempfindlichkeit und Instabilität sogar erst unmittelbar vor deren Einbringen in das Reaktionsgefäß. Verdünnt wird diese hochkonzentrierte Lösung des frisch markierten Hormons mit 1000 μl ACTH-freiem Nachwaschserum (2.3.2.6.).

2.5.2. Tracerreinigung

Ungebundenes radioaktives Restjodid und "Damage" (Molekülbruchstücke) beeinträchtigen die Reinheit des Tracers und damit die Empfindlichkeit des Radioimmunoassays erheblich, so daß eine Reinigung des frisch markierten Hormons nötig ist. Schon vor der Reinigung sollte bei einer als geglückt zu bezeichnenden Markierung der Anteil an Damage geringer als 5 %, der Anteil an Restjodid geringer als 15 % der Gesamtaktivität betragen (3).

Diese Reinigung geschieht über Quso G 32, das aus präzipitierten Silikat-Granula besteht und über die Firma Philadelphia Quartz Co., Philadelphia, zu beziehen ist. Quso G 32 besitzt eine sehr hohe Adsorptionskapazität für das unbeschädigte, also noch biologisch aktive ACTH, läßt jedoch "Damage" und nicht eingebautes Jodid im Überstand (15). Die Tracerlösung wird zu diesem Reinigungsschritt quantitativ in ein Eppendorfgemäß umpipettiert, in das man 5 mg Quso G 32 eingewogen hat. Man schüttelt nun etwa 1/2 Minute auf dem "Whirlmix", zentrifugiert dann 1/2 Minute bei 10.000 UpM in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und verwirft den Überstand.

Nach einmaligem Waschen mit 1000 ml destilliertem Wasser (anschließend wiederum 1/2 Minute schütteln, 1/2 Minute Zentrifugieren, den Überstand verwerfen) eluiert man das radioaktiv markierte Hormon von Quso G 32 mit 300 µl Aceton-Essigsäure-Gemisch (Aceton,

1 %ige Essigsäure 40/60 Vol%). Dazu schüttelt man wieder nach Zugabe der 300 μ l 1/2 Minute, zentrifugiert 2 Minuten und pipettiert nun den Überstand quantitativ in ein vorbereitetes 100 ml-Polystyrolgefäß, in dem sich 50 ml Puffer B befinden.

2.5.3. Verdünnung des Tracers und spezifische Aktivität

Um den hergestellten Tracer für unseren Radioimmunoassay verwenden zu können, mußten wir ihn auf eine geeignete Konzentration bringen, welche die Meßbedingungen im γ -Zähler berücksichtigte. Die Aktivität sollte dabei etwa 20.000 CpM betragen.

Wir entnahmen also dem frischen Tracer 100 μ l und brachten sie in ein Polystyrol-Gefäß ein, wie es zur Aktivitätsbestimmung im γ -Zähler verwendet wird. Diese Probe wird nun im "gamma guard" (Fa. ICN Tracerlab, Köln) unter folgenden Bedingungen gezählt:
Coarse Gain 64; fine Gain 1,4; Window 2,3; time pre-set 0,2 bzw. 0,5 min.

100 μ l des nicht weiterverdünnten Tracers (also von den 50 ml s.o.) hatten etwa eine Aktivität von 200.000 bis 400.000 CpM; ein Wert, der von Markierung zu Markierung natürlich relativ stark schwankte. Nach dieser Messung verdünnten wir den Tracer auf eine Arbeitskonzentration von etwa 20.000 CpM mit Puffer B. Davon

bewahrten wir etwa 100 ml in 10 ml-Fractionen auf, die wir in kleine 20 ml-Polystyrol-Gefäße füllten und bei -80°C einfroren. Den Rest des Tracers verwarfen wir, da 100 ml gut für etwa 3 - 4 Wochen ausreichten, bevor wir wieder neu markieren mußten.

Um zu wissen, wieviel pg ACTH wir in 0,1 ml Tracer pro Probe einsetzten, mußten wir folgende Punkte berücksichtigen:

Geht man von 0,5 μg frisch markiertem ACTH aus, so muß man nach unseren Aktivitätsmessungen damit rechnen, daß 90 % (d.h. 0,45 μg) des eingesetzten Hormons an Quso G 32 adsorbiert werden, daß jedoch nur etwa 20 % davon (d. h. 0,09 μg) mit dem verwendeten Aceton-Essigsäure-Gemisch extrahiert werden konnten. Diese 0,09 μg in 50 ml Puffer B (siehe 2.5.2.) ergaben ca. 80.000 Cpm/0,1 ml. Weiterverdünnt auf 200 ml (siehe 2.5.3.), ergaben etwa 20.000 Cpm/0,1 ml. Das bedeutete bei 90 ng ACTH in 200 ml Puffer, daß sich in 0,1 ml etwa 45 pg ACTH befanden.

Da 0,1 ml auch unser eingesetztes Arbeitsvolumen war, brachten wir also pro Probe 45 pg radioaktives ACTH ein, die uns eine Aktivität von etwa 20.000 Cpm lieferten. Diese Konzentration stand also in etwa in einer vernünftigen Relation zur unteren Nachweisgrenze unseres Assays (3.1.2.).

Nach unseren Versuchen konnten wir davon ausgehen, daß von 1000 μCi etwa 800 μCi in das zur Markierung angebotene Hormon eingebaut werden. Das bedeutet bei einem Einsatz von 2 μg ACTH eine spezifische Aktivität von etwa 400 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ACTH, bei Einsatz von 0,5 μg ACTH 1600 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ACTH.

2.5.4. Reinheitsprüfung des Tracers

Wie bereits erwähnt (2.5.2.), soll bei einer guten Markierung der Anteil an Damage nicht mehr als 5 %, derjenige an nicht ins Hormon eingebautem Jodid höchstens 15 % der Gesamtaktivität betragen. Eine höhere Verunreinigung würde eine Wiederholung der Markierung erfordern.

Zur Reinigung frisch markierter Hormone werden verschiedene Methoden angewandt.

Von den Möglichkeiten, den frisch markierten Tracer über eine Zellulose-Säule, eine Stärke-Gel-Elektrophorese, über eine Sephadex-Säule, oder durch Adsorption an Quiso zu reinigen, wurde für das ACTH meist die Quiso-Adsorption oder die Zellulose-Säulen-Chromatographie gewählt (3, 13, 55).

Wir bedienten uns, wie oben erwähnt, routinemäßig der Quiso-Adsorptionsmethode, wie sie schon früher im Prinzip auch für das Parathormon angewandt wurde (35, 55). Die Erfolgskontrolle dieser Reinigungsmethode geschah chromatographisch über eine Sephadex-Säule, indem sowohl ein vor Quiso-Adsorption, als auch

ein nach Adsorption entnommenes Aliquot von 20 μ l auf Damage und Jodid überprüft wurde.

Eine 30 cm hohe Glassäule mit einem Durchmesser von 1 cm beschickten wir mit Sephadex G50 fine, das 16 Stunden in destilliertem Wasser gequollen war. Zuerst trugen wir nun direkt auf das Gel - ohne dabei die Glaswand der Säule zu berühren - die 20 μ l des vor Quso-Adsorption entnommenen Tracers auf. Sodann wurde mit 0,1 % Essigsäure eluiert (13) und das Eluat mit Hilfe eines zu 0,5 ml-Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt.

Bestimmte man anschließend die Aktivität der gesammelten Proben im Tracerlab, so erschien das markierte Hormon - bisweilen von einer kleinen Damage-Schulter angeführt - in einem einheitlichen Peak nach etwa 25 bis 30 Fraktionen. Das Restjodid folgte in einem kleinen, zweiten Peak nach etwa 70 - 80 Fraktionen (Abb. 1).

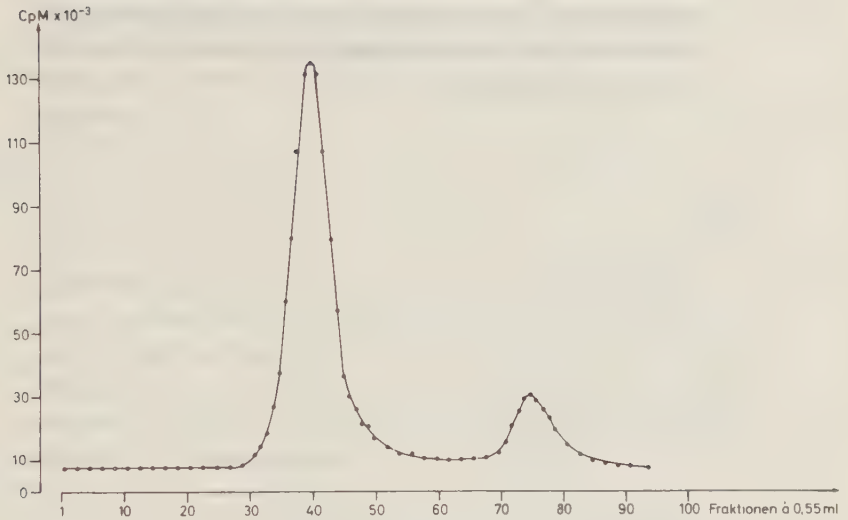


Abb. 1: Radiochromatographie eines Tracer-
Aliquots vor Quso-Reinigung:
Fraktion 30 bis 45 = Tracerpeak;
Fraktion 70 bis 80 = nicht eingebautes Jodid

Verfährt man in derselben Weise mit dem Aliquot des frischen, Quso-gereinigten Tracers, so ergibt dieses zweite Chromatogramm nun einen einzigen, reinen Hormmonpeak (Abb. 2).

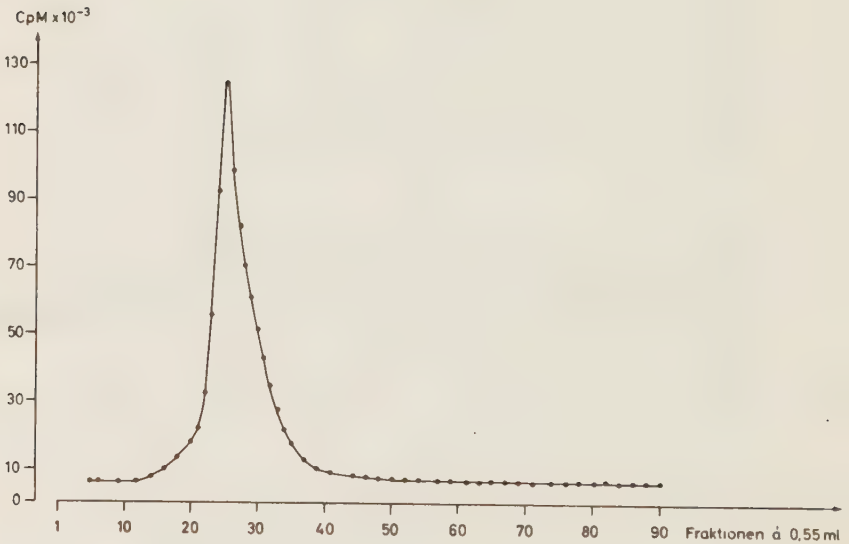


Abb. 2: Radiochromatographie eines Tracer-Aliquots nach Quso-Reinigung:
Fraktion 20 bis 35 = Tracerpeak;
kein Jodid-Rest mehr (siehe Abb. 1).

Der frische Tracer kann also mit der Quso-Adsorptionsmethode von Damage und Restjodid ausreichend gereinigt werden, und die Reinheit des Tracers kann radiochromatographisch jederzeit überprüft werden.

2.5.5. Bindungsversuch

Nach der Reinigung mußte bei jeder Markierung überprüft werden, ob der jeweilige Tracer vom ACTH-spezifischen Antikörper gebunden wird und auch - bei Zusatz von kaltem ACTH - aus dieser Bindung leicht wieder verdrängt werden kann, was ja Voraussetzung für die Erstellung einer Standardkurve bei einem Radioimmunoassay ist.

Zu diesem Zweck inkubierten wir im Rahmen eines Kurz-Bindungsversuches den jeweils frisch gereinigten Tracer mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen (1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000, 1 : 4000). Drei zusätzliche Proben mit Tracer und AK 1 in der Verdünnung 1 : 2000 setzten wir jeweils 300 µl einer "kalten" ACTH-Lösung der Konzentration 1000 pg/ml zu.

Mit Ausnahme des ersten Meßpunktes (1 : 500), der regelmäßig tiefer lag als der darauffolgende, ergaben die Punkte bei guter Tracerbindung an den Antikörper eine gute Übereinstimmung der abfallenden "bound"-Fraktion mit der geringeren Antikörperkonzentration.

Die mit "kaltem" ACTH versetzten Proben zeigten eine etwa 50 % niedrigere "B"-Fraktion als die gleichen Proben ohne "kaltes" ACTH und damit den erwünschten Verdrängungseffekt (siehe Tabelle).

Antikörperverdünnung (AK "Ulm")	CpM (arithm.Mittel aus Dreifachbestimmungen)
1 : 500	5.000
1 : 1000	6.576
1 : 2000	4.064
1 : 4000	2.166
1 : 2000 + "kaltes" ACTH	2.079

Die unspezifische Bindung N betrug bei diesen Versuchen etwa 500 CpM.

2.6. Bound-Free (B/F)-Trennung

Für die Trennung der antikörpergebundenen von der antikörperfreien Hormonfraktion gibt es mehrere Möglichkeiten.

Entweder man adsorbiert das freie Hormon, dann muß man im Überstand messen, oder man fällt die Hormon-Antikörper-Bindungskomplexe und mißt im Rückstand. Für die erstere Methode verwendet man Stoffe wie Charcoal oder Talk; sie adsorbieren das freie ACTH. Für die letztere Methode bedient man sich zum Beispiel einer Fällungsmethode oder eines zweiten Antikörpers.

2.6.1. Trennung mit Talk

Wir verfahren dabei im wesentlichen nach dem später (2.7.3.) folgenden Pipettierschema. Nur fügten wir dem Inkubationsgemisch anstelle des zweiten Antikörpers 600 μ l einer Talkaufschlemmung hinzu.

Dazu stellten wir vorher in einem Erlenmeyerkolben eine entsprechende Aufschlemmung her, so daß pro Probe 20 mg Talk in 600 μ l Puffer A zugesetzt werden konnten. Diese 600 μ l wurden mit einer Eppendorf-Mikroliterpipette aus der mittels eines Magnetrührgerätes ständig in Bewegung gehaltenen Talkaufschlemmung entnommen. So konnte man davon ausgehen, daß jeder einzelnen Probe die gleiche Menge Talk zupipettiert wurde. Dann wurden die Proben auf einem Rotationsmischer der Firma Eppendorf geschüttelt und anschließend für 2 Minuten zentrifugiert (siehe 2.5.2.).

Die Adsorption des ACTH an Talk ist von der Schüttelzeit abhängig. Die günstigste Schüttelzeit wurde folgendermaßen herausgefunden:

Wir probierten alle Schüttelzeiten in Zwei-Minuten-Abständen von 0 bis 20 Minuten aus, wobei sich bei 12 Minuten ein Plateau ergab. Wir hielten deshalb eine Schüttelzeit von 15 Minuten ein, um sicher in diesem Plateau zu liegen.

Nach dem Zentrifugieren der Proben entnahmen wir jedem Eppendorfgefäß 1000 μ l des Überstandes, pipettierten sie in Spezial-Plastikzählröhrchen, um im γ -Counter die Aktivität zu bestimmen.

2.6.2. Trennung mit Charcoal

An die Stelle der eben beschriebenen Talkaufschlemmung (2.6.1.) trat hier eine Charcoalaufschlemmung. Sie bestand gemäß einer Empfehlung von Herrn Dr. GIRARD (Basel) aus 0,25 Norit-Kohle und 0,025 % Dextran T 70 in 0,05 M Phosphat-Puffer. Jeder einzelnen Probe wurden 200 μ l dieser Aufschlemmung zugesetzt.

Auch hier schüttelten wir die Proben 15 Minuten lang und zentrifugierten sie anschließend in üblicher Weise. Dann wurden jeweils 600 μ l aus dem Überstand in die Zählgefäße entnommen und im γ -Counter die Aktivität bestimmt.

2.6.3. Trennung mit 2. Antikörper

Anstelle von Talk- oder Charcoal-Aufschlemmung verwendeten wir hier 200 μ l eines zweiten Antikörpers, mit dessen Hilfe wir die ACTH-Antikörper-Komplexe fällen konnten.

Hier führten wir also die Aktivitätsmessung nicht wie bei den beiden oben beschriebenen Methoden im Überstand durch, sondern im Rückstand.

Nach 4 Stunden Inkubation (siehe unter 2.7.2.) zentrifugierten wir die Proben drei Minuten lang (s.o.), verwarfen den Überstand und bestimmten die Aktivität des Präzipitates, welches die "bound"-Fraktion enthielt.

Als zweiter Antikörper fand dabei ein gegen Kaninchen gerichteter, beim Esel erzeugter standardisierter Antikörper der Firma Welcome Verwendung.

Die für den zweiten Antikörper günstigste Konzentration testeten wir in einer Verdünnungsreihe von 1:24, 1:36, 1:48, 1:64, 1:72, 1:96 aus, was bei den relativ hohen Kosten dieses zweiten Antikörpers auch von wirtschaftlichem Interesse war.

Die Abbildung 3 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Als Konsequenz dieses Ergebnisses wurden daher 200 μ l einer AK 2-Verdünnung von 1:48 eingesetzt.

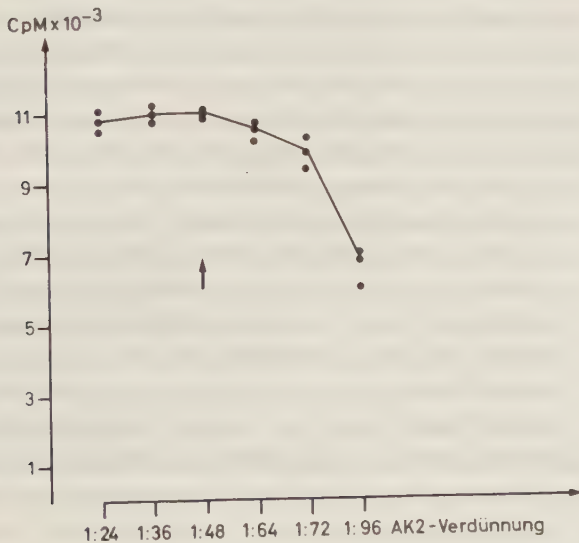


Abb. 3: Abhängigkeit der Bindungsraten von der Verdünnung des 2. Antikörpers

2.6.4. Vergleich der verschiedenen Trennungsmethoden

Folgende Ergebnisse beim Vergleich der oben beschriebenen Methoden führten uns dazu, in der Regel die "bound-free"-Trennung mit Hilfe des 2. Antikörpers vorzunehmen.

2.6.4.1. Die Streuung der Dreifachwerte

Sie war bei der Trennung mit Hilfe des 2. Antikörpers weitaus am geringsten und nahm bei Verwendung von Talk deutlich, bei Verwendung von Charcoal sogar erheblich zu.

Eine erhöhte Streuung der Mehrfachwerte wirkt sich aber negativ auf die Zuverlässigkeit der einzelnen Meßwerte und damit auch auf die Genauigkeit der erstellten Standardkurve aus. Die Gründe für die größere Streuung der Mehrfachwerte sind arbeitsmethodisch bedingt. Zu berücksichtigen ist dabei der Zeitfaktor, der bei den langen Schüttelzeiten (2.6.2., 2.6.3.) und dem langwierigen Abpipettieren der Aliquots zumal bei einer größeren Probenzahl störend wirkt. Zum anderen muß man die beim Abpipettieren der Überstandaliquots auftretenden Schwankungen und Fehler berücksichtigen. Außerdem ist noch wichtig, daß beim Abpipettieren eines solchen Aliquots häufig eine zwar geringe, aber doch ins Gewicht fallende Menge des herunterzentrifugierten Adsorbates wieder aufgewirbelt wird und somit in das zu messende Aliquot gerät, wo

es den eigentlichen Bindungswert verfälscht. Da nun die Kohleaufschlemmung viel feiner ist als die Talkaufschlemmung, ist leicht einzusehen, daß dieser Effekt bei der ersteren viel stärker zum Tragen kommen muß und so die Mehrfachwert-Streubreite viel nachdrücklicher beeinflußt, als dies bei der Talkaufschlemmung der Fall ist.

2.6.4.2. Höhe der erreichten Bindungswerte an den 1. Antikörper

Vergleicht man die B_0 -Werte bei den drei verwendeten Trennungsmethoden, so erreicht man mit der Talktrennung etwa 70 - 80 % der B_0 -Werte mit dem 2. Antikörper, und nur 50 - 60 % mit der Charcoal-Trennung. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, daß eben nicht die gesamte Aktivität gemessen wird, sondern ein Aliquot des Überstandes (bei Talk- und Charcoal-trennung). Andererseits werden jedoch entweder Anteile der AK 1-ACTH-Molekülkomplexe adsorbiert - was unwahrscheinlich ist - oder es kommt zum sogenannten "Stripping", d. h., ACTH wird teilweise durch die starke Adsorptionsaffinität von Talk und Charcoal aus seiner Bindung an den Antikörper gelöst und damit in den Niederschlag "gezogen".

2.6.4.3. Untere Nachweisgrenze

Da auch Standardkurven, bei denen die "bound"-Fraktionen mit Hilfe von Talk, und noch mehr solche, bei denen sie mit Hilfe von Charcoal getrennt worden waren,

bei steigendem Anteil an "kaltem" ACTH flacher verliefen als Standardkurven, bei denen die "bound"-Fraktion mit Hilfe eines 2. Antikörpers getrennt worden war, kann man sagen, daß die Trennung mit einem zweiten Antikörper besser geeignet ist, auf geringe Konzentrationsänderungen an endogenem ACTH mit einem entsprechenden Aktivitätsabfall der "bound"-Fraktion zu antworten und diese somit objektiv anhand einer Standardkurve ablesbar zu machen.

Dazu kommt noch, daß die oben angesprochenen schlechten Mehrfachwerte natürlich besonders im Bereich niedriger ACTH-Konzentrationen mit geringer Verdrängung ins Gewicht fallen. Gerade in diesem Bereich aber muß bei der ACTH-Bestimmung wegen der niedrigen Plasmakonzentrationen meistens abgelesen werden.

Die untere Nachweisgrenze war für die Zwecke unseres Radioimmunoassays bei Kohletrennung untragbar, bei Talktrennung schlecht und genügte nur bei Trennung mit Hilfe des 2. Antikörpers gerade unseren Ansprüchen.

Durch Zusatz von Kaninchen- γ -Globulin versuchten wir über eine verbesserte und selektivere Fällung zu noch höheren Bindungsergebnissen zu kommen. In der 2. Medizinischen Universitätsklinik München besteht große Erfahrung mit der Doppelantikörpermethode. Bei manchen Assays - so etwa bei der radioimmunologischen TSH-Bestimmung - bewirkt der Zusatz von Kaninchen-Serum als Co-Präzipitat eine verbesserte Bindung zwi-

schen Hormon und Antikörper (12). Bei beiden von uns verwendeten ACTH-spezifischen Antiseren testeten wir den Effekt nach Zusatz von Kaninchenserum bzw. Kaninchen- γ -Globulin (Fa. Serva, Heidelberg).

In jeweils 100 μ l setzten wir verschiedene Konzentrationen an Kaninchen- γ -Globulin von 0 über 1, 2, 3, ... bis 7 μ g ein. Es ergab sich jedoch in keinem Fall eine Verbesserung der Bindungsverhältnisse.

Mit beiden Antiseren, die wir im Assay einsetzten, wurde also schon genügend γ -Globulin eingebracht, so daß ein weiterer Zusatz von γ -Globulin keine Verbesserung der Fällungsergebnisse mehr brachte.

Ein Zusatz von Kaninchen- γ -Globulin war also unter Verwendung unserer beiden ACTH-spezifischen Antiseren nicht nötig. Bei einem Wechsel auf ein anderes ACTH-Antiserum müßte dieser Punkt jedoch selbstverständlich wieder neu überprüft werden.

2.6.4.4. Die unspezifische Bindung

Auch die Höhe der unspezifischen Bindung war ein wichtiger Gesichtspunkt, der die Wahl zwischen einer dieser Trennungsmethoden beeinflusste.

Während die unspezifische Bindung bei der Trennung mit dem 2. Antikörper bei ca. 2 % der Gesamtaktivität des jeweils verwendeten Tracers lag, stieg sie bei Talktrennung auf 4 % und bei Charcoaltrennung sogar auf 10 %.

Die unspezifische Bindung wird ausschließlich in einem Ansatz mit Tracer und 2. Antikörper bzw. Talk oder Charcoal bestimmt. Das Volumen des bei den anderen Proben zugesetzten 1. Antikörpers und des ACTH-Standards wird hier durch Puffer A substituiert. Die unspezifische Bindung sagt etwas über die Selektivität aus, mit der - je nach verwendetem Trennungssystem - der freie Tracer bei der Talk- oder Charcoaltrennung adsorbiert wird oder bei der Fällung mit einem 2. Antikörper nicht gebunden wird.

2.6.5. Folgerungen

Alle unter 2.6.4.1. bis 2.6.4.4. betrachteten Punkte sprachen für die Doppelantikörpermethode zur "bound-free"-Trennung. Insbesondere die Empfindlichkeit der Standardkurven konnte unter Verwendung des 2. Antikörpers gegenüber den anderen Trennungsmethoden erheblich gesteigert werden.

Da wir unseren Radioimmunoassay mit dem Ziel aufgebaut haben, eine für die Routinebestimmung taugliche Methode anbieten zu können, war natürlich auch eine mögliche Automatisierung der Methode von größtem Interesse. Für Radioimmunoassays, die nach der Doppelantikörpermethode durchgeführt werden, wurde an der 2. Medizinischen Universitätsklinik München ein modulares Analysensystem zur Vollmechanisierung erarbeitet (27). Dies war ein weiterer Grund, für den

ACTH-Radioimmunoassay einen 2. Antikörper zur "bound-free"-Trennung zu verwenden, denn so bietet sich die Möglichkeit, auch diesen Assay automatisiert arbeiten zu lassen. Durch eine solche Automatisierung könnte die Methode genauer, zeitsparender und mit größerer Kapazität arbeiten.

2.7. Inkubationsansatz

2.7.1. Volumina

Es wurden Volumina gewählt, die es erlaubten, die Bestimmungsmethode im Eppendorf-Reaktionsgefäß-System durchzuführen. Wir verwendeten Mikroliterpipetten der Fa. Eppendorf, sowie Repetierpipetten der Fa. Hamilton.

Das Gesamtvolumen betrug 800 μ l. Es setzte sich zusammen aus

300 μ l Standard bei allen Meßpunkten der Standardkurve oder Puffer A bei allen B_o -Werten sowie bei den Werten zur Ermittlung der unspezifischen Bindung oder 300 μ l Serumprobe.

200 μ l ACTH-Antiserum oder Puffer A bei den Werten zur Ermittlung der unspezifischen Bindung.

100 μ l Tracer

200 μ l Antikörper-2-Lösung.

2.7.2. Inkubationszeiten

Sowohl für den ersten wie auch für den zweiten Antikörper testeten wir die optimalen Inkubationszeiten aus.

Wir suchten jenen kürzesten Zeitpunkt zwischen 0 und 6 Tagen, bei welchem sich die Reaktion nach Zugabe des 1. bzw. 2. Antikörpers im Gleichgewicht befand.

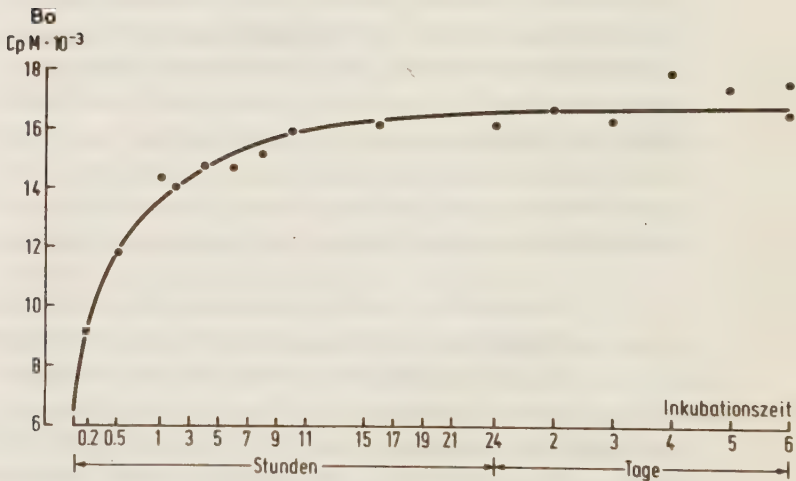


Abb. 4: Inkubationskinetik für den 1. Antikörper.
Nach 16 Stunden ist das Plateau erreicht.

Der gesamte Ansatz für alle gemessenen Zeitpunkte (jeweils Zweifachwerte) wurde pipettiert. Danach froren wir nach der für jeden Meßpunkt abgelaufenen Zeit die jeweiligen Proben in flüssigem Kohlendioxid auf -156°C ein und bewahrten sie bei -80°C im Gefrierschrank auf. Nach Ablauf des sechsten Tages wurde der gesamte Ansatz aufgetaut und mit dem zweiten Antikörper versetzt. Nach Aufarbeiten und Messen der Proben (2, 9) zeigte sich, daß die durch die aufgetragenen Meßpunkte gezogene Kurve bei 16 Stunden ihr Plateau erreicht und damit anzeigt, daß die Reaktion sich ab diesem Zeitpunkt im Gleichgewicht befindet. Nach 16 Stunden ändert sich an der Bindung in der bis 6 Tage überprüften Zeit nichts Wesentliches mehr.

Eine Inkubationszeit von 16 Stunden darf also als gerechtfertigt angesehen werden. Die in der Literatur (3, 44, 49) oft angegebene Zeit von 6 Tagen darf nach unseren Ergebnissen auf 16 Stunden verkürzt werden, was eine erhebliche Zeitersparnis mit sich bringt.

Auf dieselbe Art und Weise wurde auch die Inkubationszeit für den 2. Antikörper ermittelt. Die Kurve erreicht hier schon nach $3\frac{1}{2}$ Stunden ihr Plateau. Eine Inkubationszeit von 4 Stunden ist hier also ausreichend.

2.7.3. Pipettier- und Inkubationsschema

6 B₀-Werte, welche die maximale Bindung zwischen Tracer und Antikörpersystem repräsentieren. In diesem Inkubationssatz sind nur Tracer, ACTH-spezifischer Antikörper und 2. Antikörper enthalten. Der ACTH-Standard ist durch die entsprechende Menge Puffer A ersetzt.

Jeweils Dreifachwerte für jeden Standard-Kurvenpunkt. Gemessen wird die "bound"-Fraktion in Anwesenheit eines kompetitiv verdrängenden kalten ACTH-Standards verschiedener Konzentration. Das Inkubationsgemisch bilden Standard (bzw. Serumprobe), ACTH-spezifischer Antikörper, Tracer sowie Antikörper 2.

Dreifachwerte zur Ermittlung der unspezifischen Bindung.

Sie repräsentieren jene Bindung, welche der Tracer mit anderen Bestandteilen des Inkubationsansatzes außer dem Antikörpersystem eingeht.

Im Inkubationsgemisch befinden sich Tracer, Antikörper 2, sowie die entsprechende Menge Puffer anstelle des Standards und des ACTH-spezifischen Antikörpers.

	B _O -Wert	Probe	T=unspez. Bindung
Serum bzw. Standard	--	300 µl	--
Puffer A	300 µl	--	300 µl
AK1-Lösung mit Anti- ACTH	200 µl	200 µl	--
Puffer A	--	--	200 µl

1 Tag Vorinkubation (siehe 3.1.1.) bei 4°C

nach einem Tag:

¹²⁵ J-ACTH (Tracer)	100 µl	100 µl	100 µl
--------------------------------	--------	--------	--------

16 Stunden Inkubation bei 4°C

nach 16 Stunden:

AK2-Lösung	200 µl	200 µl	200 µl
------------	--------	--------	--------

4 Stunden Inkubation bei 4°C; anschließend Zentrifugieren aller Proben, 3 Minuten bei 6000 g, Absaugen und Verwerfen der Überstände, sowie Aktivitätsmessung der Rückstände während 1 Minute im Gamma-Zählgerät: Gammaguard, Tracerlab.

Ein zusätzliches Mischen der Proben zwischen den einzelnen Pipettierschritten erübrigt sich bei Verwendung von Eppendorf-Spezial-Mikroliterpipetten bzw. Hamilton-Repetier-Mikroliterpipetten, da die Schärfe des eintretenden Strahles für ein ausreichendes Durchmischen der Lösung sorgt.

2.8. Inkubationstemperatur

Der unter 2.7.2. beschriebene Versuch wurde sowohl bei 4°C als auch bei Zimmertemperatur durchgeführt, um einen etwaigen Einfluß der Inkubationstemperatur feststellen zu können.

Obwohl sich dabei ergab, daß sich die absoluten "bound"-Anteile und damit der Kurvenverlauf der Inkubationskinetik nicht nennenswert ändert, ob bei 4°C oder bei Zimmertemperatur inkubiert worden war, inkubierten wir dennoch sicherheitshalber bei 4°C, da diese Temperatur im Kühlraum jederzeit konstant gewährleistet war, und so unnötige Temperaturschwankungen ausgeschlossen werden konnten.

2.9. Aktivitätsmessung und Auswertung

Jedes Eppendorfgefäß kommt in ein 20 ml Plastikgefäß (Fa. Greiner Labortechnik), welches in die Behälterkette des Gamma-Zählgerätes Gammaguard der Firma Tracerlab paßt.

Das Gerät mißt automatisch die Aktivität jeder einzelnen Probe und druckt Probennummer, Zählzeit und Zählrate aus. Alle Daten werden gleichzeitig in einen Lochstreifencode übersetzt, mit Hilfe dessen der Radioimmunoassay automatisch ausgewertet wird.

An der Medizinischen Klinik Innenstadt München wurde ein neues Verfahren zur Berechnung eines stetigen, optimal geglätteten Kurvenverlaufs aus experimentellen Daten radioimmunologischer Standardkurven aufgebaut, die auf der mathematischen Basis der Spline-Approximation (von REINSCH beschrieben) beruht und uns die Möglichkeit der Computer-Auswertung bot (26).

3. ERGEBNISSE

3.1. Empfindlichkeit

3.1.1. Vorinkubation

Es hatte sich beim TSH-Radioimmunoassay herausgestellt, daß eine Vorinkubation mit kaltem Hormon die Empfindlichkeit der Methode steigerte (12).

Wir verglichen deshalb Standardkurven ohne Vorinkubation und solche mit ein-, zwei-, drei- und fünftägiger kalter Vorinkubation. "Kalte" Vorinkubation heißt dabei, daß man Standard bzw. Serum und Antikörper vorinkubiert und erst dann das "heiße" Hormon zusetzt. Wir konnten mit dieser Vorinkubation eine erhebliche Empfindlichkeitssteigerung erreichen (Abb. 5), wobei der entscheidende Effekt nach einem Tag erreicht war. Eine längere Vorinkubation brachte keinen nennenswerten Vorteil mehr.

Mit Hilfe der Vorinkubation konnten wir einen steileren Kurvenverlauf erreichen, was die Ablesbarkeit zweier verschiedener Hormonkonzentrationen verbesserte. Im Wendepunkt der Standardkurve wurde dadurch eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 2 erreicht, denn die von derselben "bound"-Fraktion repräsentierte Standardkonzentration ist hier halb so groß wie jene ohne Vorinkubation.

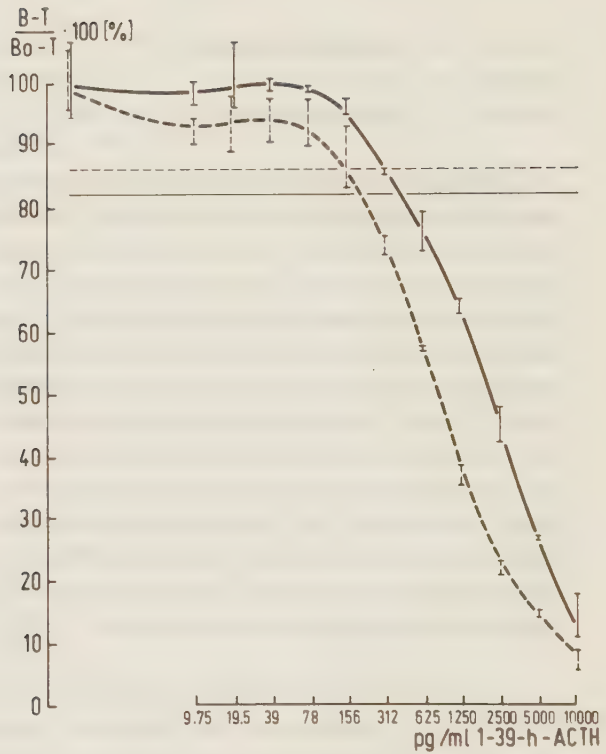


Abb. 5: Empfindlichkeitssteigerung der Standardkurven durch "kalte" Vorinkubation

— = ohne Vorinkubation

- - - = eintägige Vorinkubation

3.1.2. Standard und Antikörper

Es erwies sich, daß die Empfindlichkeit der Standardkurven in erheblichem Maße vom jeweils verwendeten Standard und Antikörper abhängt.

Bei Verwendung des Ulmer Antikörpers (2.4.) erreichten wir mit Schweine-ACTH als Standard (2.3.1.) die besten Ergebnisse. Dies war auch zu erwarten, da dieser Antikörper ja von Kaninchen gegen Schweine-ACTH gebildet worden war.

Wir erreichten mit dieser Kombination eine Empfindlichkeit von 39 pg/ml, d. h.: 13 pg im Ansatz (Abb. 6).

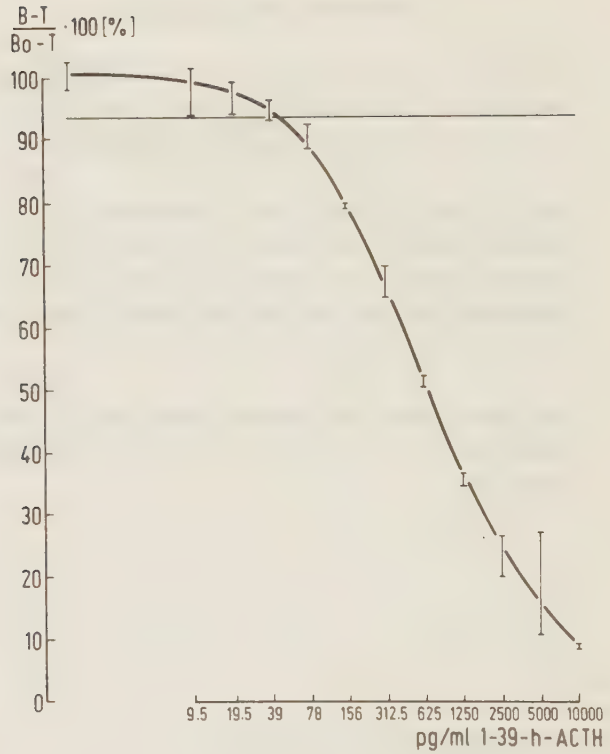


Abb. 6: Untere Nachweisgrenze bei Verwendung von "Antikörper Ulm" und Schweine-ACTH als Standard: 39 pg/ml = 13 pg im Ansatz

Mit dem Antikörper aus Marseille lieferte das 1-39 human ACTH der Firma Ciba die empfindlichsten Standardkurven, obwohl auch zur Produktion dieses Antikörpers Meerschweinchen mit Schweine-ACTH sensibilisiert wurden (44).

Die mit dieser Kombination erreichte Empfindlichkeit lag mit 9,5 pg/ml erheblich günstiger (Abb. 7).

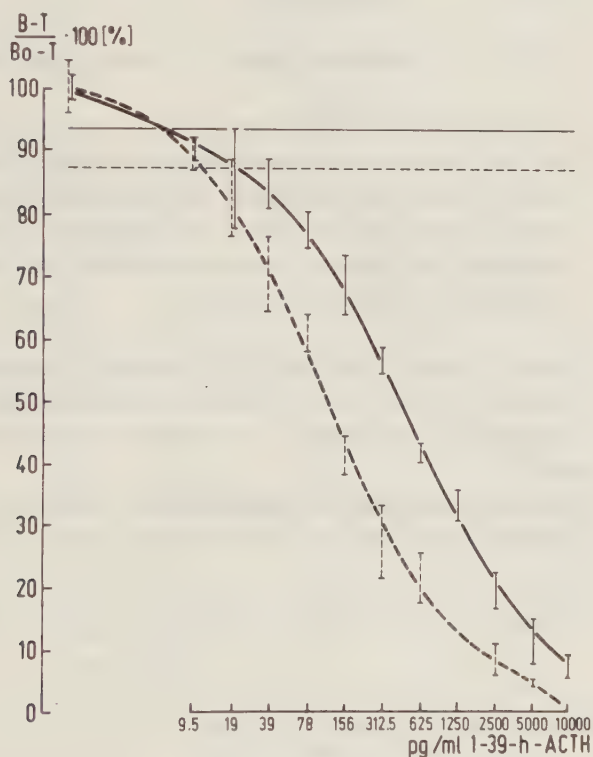


Abb. 7: Untere Nachweisgrenze bei Verwendung von "Antikörper Marseille" und 1-39 human ACTH (-----) bzw. Schweine-ACTH (—):
9,5 pg/ml = 3,3 pg im Ansatz.

Die geringste, von Null unterscheidbare Konzentration an ACTH war bei unserem Radioimmunoassay also 3,3 g pro Ansatz. Die Werte pro Ansatz ergeben sich nach Division der Konzentrationen pro ml durch 3,3, da ja pro Probe nicht 1000 μ l sondern nur 300 μ l eingesetzt wurden.

3.2. Richtigkeit

3.2.1. Standardkurven in Puffer und Serum

Eine wesentliche Voraussetzung für die Richtigkeit der mit unserem Radioimmunoassay direkt bestimmten ACTH-Konzentrationen war, daß die gleiche Hormonmenge sowohl in Puffer als auch in Serum die gleiche Verdrängung des Tracers aus der Bindung mit dem 1. Antikörper zur Folge haben sollte.

Um mit unserer Methode ACTH direkt im Serum messen zu können, war also ein identischer Verlauf der Standardkurven in Puffer- und Serummilieu zu fordern.

Um diese Bedingung zu überprüfen, setzten wir Standardkurven in Puffer und ACTH-freiem Serum (siehe 2.3.2.6.) an.

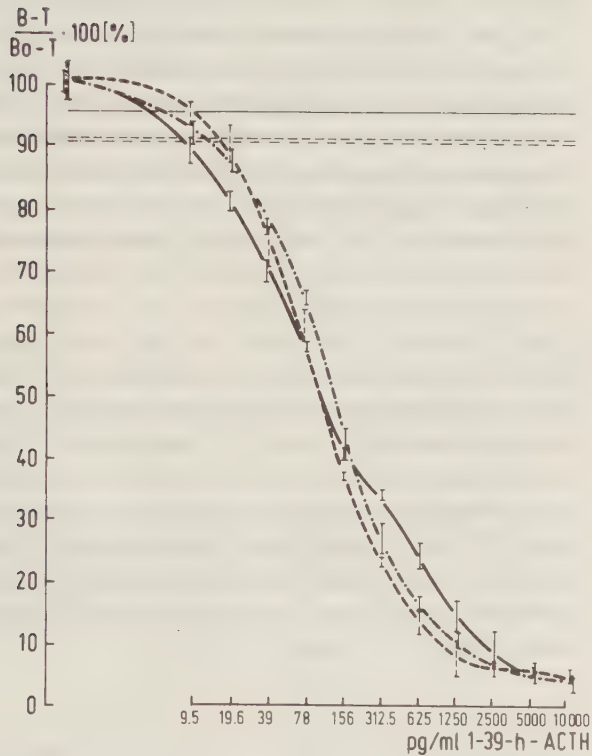


Abb. 8: Vergleich von Standardkurven in Puffer und Serum (A.K. "Marseille", 1-39 human ACTH Ciba)

- Puffer
- Serum (Routinepool der klinischen Chemie 2.3.2.6.)
- Serum (nach Dexamethason-suppression) 2.3.2.6.)

Es ergab sich dabei zwar ein etwa identischer Verlauf der Kurven, jedoch differierten die Absolutwerte (in CpM) der Kurvenpunkte um 10 % der B_0 -Fraktion, wobei die Punkte der Serumverdünnungskurven unter denjenigen der Pufferkurve lagen. Die Serum-Standardkurve verlief also in Wirklichkeit gegenüber der Pufferkurve nach unten versetzt. Das nahezu identische Kurvenbild ist durch die automatische Auswertung der Meßergebnisse mit Hilfe der "Spline-Approximation" zu erklären, die eine mathematische Vergleichsoptimierung der Kurven bewirkt.

Dieses Ergebnis kann sicher nicht mit einer vorliegenden Rest-ACTH-Aktivität in den sogenannten Nullseren erklärt werden (2.3.2.6.). Schließlich findet sich dieses gleiche Phänomen für zwei auf völlig unterschiedliche Weise entstandene Nullseren (Stehenlassen bei 4°C bzw. Dexamethason-Suppression). Man muß dagegen unspezifische Serumprotein-Bindungskapazitäten vermuten, die einen Teil des Hormons der Bestimmung entziehen.

3.2.2. Serum-Verdünnung

Eine weitere Voraussetzung für eine direkte Vergleichbarkeit unbekannter Patientenserum mit einer Standardkurve ist die richtige Ablesbarkeit jeder beliebigen Verdünnung dieser Seren an der Puffer-Standardkurve. Bei einem 1:2 verdünnten Serum muß also auch die auf der Standardkurve abgelesene Hormonkonzentration genau die Hälfte des unverdünnten Serums betragen.

Um diese Voraussetzung zu überprüfen, setzten wir verschiedene Seren von Patienten mit bekannt erhöhten ACTH-Spiegeln in Verdünnungen ein und verglichen die abgelesenen Konzentrationen mit den Verdünnungsverhältnissen.

Serum Nr.	Patient (Diagn.)	Plasma-Volumen	CpM	ACTH (pg)
1	M.S. weibl. (Nelson S.)	300 µl	737	1250
		30 µl	1223	70
		3 µl	2051	12
2	E.B. weibl. (Nelson S. postop.)	300 µl	4931	Werte nicht meßbar, da höher als B ₀ (B ₀ = 2522)
		150 µl	3910	
3	G.J. weibl. (zentr.Cushing S.)	300 µl	4499	" "
		150 µl	3702	

Wie die vorstehende Tabelle erkennen läßt, zeigt nur Serum 1 eine zufriedenstellende Übereinstimmung von Konzentrationsabfall und entsprechendem Anstieg der "B"-Fraktion.

Bei den Seren 2 und 3 zeigt sich ein völlig paradoxer Abfall der Bindungsrate trotz Serumverdünnung und somit verminderter Hormonkonzentration. Auch liegen alle Ergebnisse (in CpM) noch oberhalb der B_0 -Werte, so daß trotz zu erwartender hoch normaler bzw. erhöhter ACTH-Spiegel kein ACTH in diesen Seren meßbar war.

Serum 1 der Patientin, die aufgrund eines Nelson-Syndroms einen bekannt hohen ACTH-Spiegel hat, und bei dem wir eine gute Übereinstimmung von Verdünnungsverhältnis und abgelesener ACTH-Konzentration gefunden hatten, verdünnten wir nun von 300 μ l auf 150, 75, 37,5 ... 0,25 μ l. Die dabei erhaltenen Meßpunkte verglichen wir mit der Standardkurve. Dazu wurde derjenige Dreifachwert mit der geringsten Streubreite auf die Standardkurve gelegt, um von diesem Punkt aus die anderen Meßpunkte zu extrapolieren.

Die so erhaltene Serum-Verdünnungskurve zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Standardkurve (siehe Abb. 9). Leider war jedoch diese Übereinstimmung und damit direkte Ablesbarkeit eines Serums und seiner Verdünnungen auf der Standardkurve - wie schon oben erwähnt - nicht bei allen Seren gegeben (siehe auch Kap. 3.3.3.).

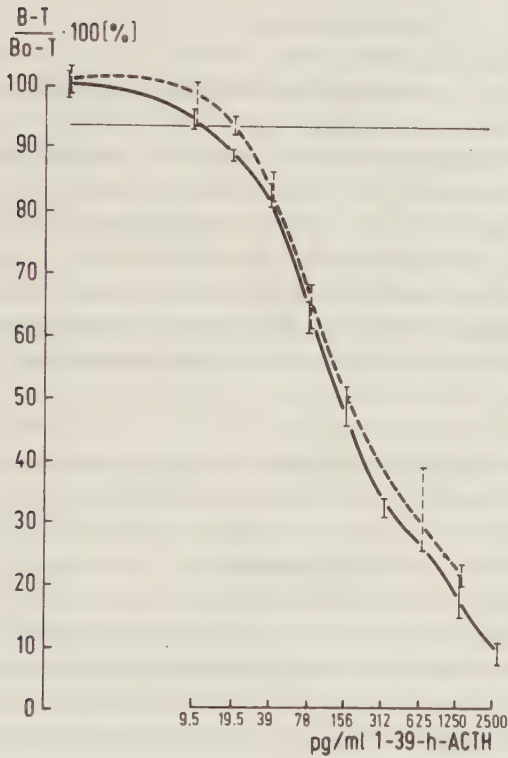


Abb. 9: Vergleich einer Serumverdünnungskurve
(-----) (Serum 1 im obigen Text)
mit einer Puffer-Standardkurve (——)

3.3. Meßergebnisse.

3.3.1. Pathologisch erhöhte Serumwerte

Die ACTH-Spiegel zweier Seren von Patienten, bei denen aufgrund der klinischen Diagnose (Nelson-Syndrom) deutlich erhöhte ACTH-Spiegel zu erwarten waren, bestimmten wir radioimmunologisch. Dabei konnten wir auch tatsächlich erheblich erhöhte Hormonspiegel feststellen. Direkte Vergleichsmessungen mit einer biologischen Bestimmungsmethode (2,31) liegen leider nicht vor.

- a) M. weibl. (30.07.74) 1516 pg/300 µl = 5002 pg/ml
b) M. weibl. (24.04.75) 1003 pg/300 µl = 3309 pg/ml

3.3.2. Stimulationstest

Eine andere Patientin mit einem zentralen Cushing-Syndrom hatte sich aus diagnostischen Gründen einem Lysin-Vasopressin (LVP)-Stimulationstest unterzogen. Die ACTH-Spiegel wurden vor und direkt nach einer 1-stündigen Infusion von 5 I.E. LVP radioimmunologisch gemessen:

G.J. weibl. 0 min. 0 pg/300 µl ACTH = 0 pg/ml
 60 min. 148 pg/300 µl ACTH = 488 pg/ml

Der Anstieg des direkt im Serum gemessenen ACTH nach LVP zeigt hier, daß zumindest stimulierte ACTH-Spiegel

im Serum erfaßt werden können, ohne daß allerdings zur "Richtigkeit" dieser Werte etwas gesagt werden kann. Es sei jedoch erwähnt, daß gerade Serum-Basalwerte dieser Patientin im Verdünnungsversuch (3.2.2.) einen paradoxen Abfall der "bound-Fraktion" zeigten.

3.3.3. Normalkollektiv

Wir haben gezeigt, daß wir mit unserer Methode ohne Serumextraktion einige erhöhte ACTH-Serumkonzentrationen messen können.

Um feststellen zu können, in welchen Grenzen sich die ACTH-Konzentrationen von Normalpersonen in diesem direkt messenden ACTH-RIA bewegen, stellten wir ein Normalkollektiv zusammen. Dieses setzte sich aus zehn Mitarbeitern der Klinik zusammen. Gemessen wurde von jedem der gesammelten Seren ein unverdünnter Wert - also 300 µl Einsatz - und ein auf 1:2 verdünnter Wert (150 µl Serum auf 300 µl mit Nullserum wie unter 2.3.2.6.), s. Tabelle 3. Der mitgemessene verdünnte Wert sollte wieder zur Überprüfung der Richtigkeit unserer gemessenen Werte dienen, denn ein auf 1:2 verdünntes Serum sollte schließlich infolge der halben ACTH-Konzentration die doppelte "B"-Fraktion des unverdünnten Serums ergeben (siehe auch 3.2.).

Tab. 3: ACTH-RIA-Werte bei Normalpersonen

	CpM	pg/300 μ l Serum	CpM	pg/150 μ l Serum	= pg/300 μ l Serum x 2
1. H. männl.	5236	45	5266	43	86
2. S. weibl.	5614	24	5450	33	66
3. W. männl.	5064	54	5019	56	112
4. F. weibl.	5373	38	5180	48	96
5. K. männl.	3850	125	3554	147	294
6. E. männl.	4996	58	5340	39	78
7. L. männl.	5033	56	5275	43	86
8. B. weibl.	5197	47	5524	29	58
9. M. männl.	4711	73	5073	53	106
10. E. männl.	5413	36	5545	28	56

Es zeigte sich dabei, daß wir mit unserer Bestimmungsmethode durchaus in der Lage waren, Normalwerte zu messen.

Der erwartete Anstieg der "bound"-Fraktion bei Verdünnung der Seren stellte sich jedoch nur teilweise ein (Seren 1, 6, 7, 9, 10). Und auch unter diesen Seren erfolgte der Anstieg der Zählrate nur bei einem Serum (Serum 8) etwa in dem Maße, wie es theoretisch zu erwarten gewesen wäre, denn bei einer 1:2 Verdünnung sollte der Wert des verdünnten Serums nach Multiplikation mit 2 den Wert des unverdünnten Serums ergeben.

Diejenigen Seren, welche nach Verdünnung einen unzureichenden Konzentrationsabfall an ACTH anzeigen, liefern also entweder falsch hohe, oder - was wahrscheinlicher ist - die unverdünnten Seren falsch niedrige Ergebnisse.

Einige Seren lieferten bei diesem Versuch paradoxe Ergebnisse, indem sie nach Verdünnung sogar entsprechend dem Abfall der Zählraten (in CpM) einen höheren ACTH-Spiegel in den verdünnten Seren als in den unverdünnten ergaben (Seren 2, 3, 4, 5).

4. DISKUSSION

Beim Versuch, das Methodenprinzip des Radioimmunoassays auf das adrenocorticotrope Hormon anzuwenden und möglichst unter Umgehung einer Extraktionsmethode das Hormon direkt messen zu können, traten eine Reihe von spezifischen Problemen auf, welche die jahrelangen Bemühungen um diesen Assay vielleicht etwas verständlicher machen.

So stellt etwa die äußerst kurze Halbwertszeit des ACTH (3, 9) besondere Ansprüche an Blutentnahme und Aufbewahrungsverhältnisse. Um einen möglichst konstant hohen Prozentsatz an intaktem Hormon zu erhalten, wurden die Blutproben in EDTA-beschichteten Reagenzgläser gesammelt, die in Eisbad standen. Plasmen, Standards und Tracer wurden sofort nach Verdünnung bei -80°C eingefroren. In den zur Verdünnung verwendeten Puffern dienten Trasylol und Mercaptoaethanol als Schutz gegen proteolytische und oxidative Molekülzerstörung.

Eines der entscheidenden Probleme war der ACTH-spezifische Antikörper. Wegen der geringen Antigenität des Hormons infolge Molekülgröße und -struktur sowie wegen der die Antikörperbildung hemmenden "Corticoid-wirkung" gibt es nur wenige einigermaßen zufriedenstellende selektive Antikörper mit einer genügend hohen Affinitätskonstanten. Neben den Antikörpern aus Ulm und Marseille, welche uns nur in begrenztem

Maße zur Verfügung standen, versuchten wir deshalb auch eigene Antiseren in Kaninchen zu gewinnen. Zwar fanden wir dabei Antikörper mit zufriedenstellenden Bindungseigenschaften, jedoch konnte der gebundene Tracer nicht mehr von kaltem Hormon aus der Bindung verdrängt werden. Somit waren diese Antiseren im Radioimmunoassay nicht einsetzbar.

Außerdem war für uns von wichtiger Bedeutung, welche "bound-free"-Trennungsmethode die günstigsten Ergebnisse für unseren Assay lieferte. Unter getesteten Methoden der Trennung mit Hilfe von Talk, Charcoal und einer Doppelantikörpermethode schnitt die letztere weitaus am besten ab. Sie erbrachte uns die besten Dreifachwerte, die höchsten Bindungsergebnisse, die niedrigste untere Nachweisgrenze, die geringste unspezifische Bindung und zusätzlich die Möglichkeit der späteren Automatisierbarkeit der Methode. Deshalb wählten wir die Doppelantikörpermethode als die geeignetste "bound-free"-Trennungsmethode für den ACTH-RIA aus.

Ein weiteres ungelöstes Problem waren die jeweils für den 1. und 2. Antikörper auszutestenden Inkubationskinetiken. Nach genauen Untersuchungen konnten wir die mehrfach in der Literatur beschriebenen (3, 44) Inkubationszeiten von etwa 6 Tagen für den 1. ACTH-spezifischen Antikörper auf 16 Stunden senken, was die Dauer des einzelnen Inkubationsansatzes erheblich verkürzte. Für jeden einzelnen der verwen-

deten Antikörper mußte die dazugehörige Inkubationszeit getestet werden. Ein Wechsel auf einen anderen Antikörper würde auch eine Überprüfung der dabei gefundenen Ergebnisse zur Folge haben müssen.

Wegen der sehr geringen Plasmakonzentration des ACTH bei Normalpersonen (etwa 20 bis höchstens 150 pg ACTH/ml (3, 18, 44, 55)), war an diesen Radioimmunoassay die Anforderung einer äußerst hohen Empfindlichkeit gestellt. Eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung konnten wir dabei durch eine eintägige kalte Vorinkubation erreichen. Außerdem galt es, unter den uns zur Verfügung stehenden Standards und Antikörpern diejenige Kombination herauszufinden, welche die empfindlichste Standardkurve zu liefern im Stande war. Wir stellten dabei fest, daß die Kombination human-Ciba - ACTH und Antikörper "Marseille" die weit empfindlichste Standardkurve erbrachte. Wir erreichten damit eine untere Nachweisgrenze von 9,5 pg/ml.

Der ausstehende Beweis der Richtigkeit von Meßwerten, die an unseren Standardkurven abgelesen werden konnten, sollte in einem Vergleich zwischen Puffer- und Serum-Standardkurve erbracht werden. Dabei zeigte sich allerdings, daß der Verlauf beider Kurven zwar parallel erfolgte, daß jedoch die Plasma-Standardkurve in ihren Absolutwerten um zumindest 10 % des B_0 -Wertes unterhalb der Puffer-Standardkurve verlief

(unspezifische Serumbindung ? siehe 3.2.1.). Der scheinbar identische Kurvenverlauf war lediglich durch die mathematische Kosmetik der automatischen Auswertung der Meßpunkte vorgetäuscht.

Die für die Richtigkeit weiterhin geforderte Parallelität einer Eichkurve und einer Serum-Verdünnungskurve mit bekannter Hormonkonzentration konnte leider nur in einem Fall mit sehr hohen ACTH-Spiegeln nachgewiesen werden. Bei zwei anderen Seren ergab sich entweder nur ein der Verdünnung inadäquater Abfall der abgelesenen ACTH-Konzentration, oder gar ein vollkommen paradoxes Verhalten dahingehend, daß die an der Standardkurve abgelesene Konzentration bei verdünnten Seren höher zu sein schien als bei unverdünnten. In einzelnen Fällen wurde auch überhaupt keine ACTH-Aktivität im Plasma radioimmunologisch gemessen. Vielmehr lagen die B-Werte oberhalb von B_0 mit paradoxem Abfall bei Verdünnung des Serums. Auch war bei einer Patientin mit zentralem Cushing-Syndrom nur nach einer LVP-Stimulation meßbares ACTH im Plasma trotz niedriger unterer Nachweisgrenze vorhanden.

Auch beim Versuch, Hormonkonzentrationen von Normalpersonen richtig zu messen, sahen wir uns großen Schwierigkeiten gegenüber. Bei der von uns erreichten Empfindlichkeit des Assays hätten wir Normalkonzentrationen durchaus messen können. Es zeigte sich jedoch, daß wir zwar bestimmte Konzentrationen anhand der

Standardkurve ablesen konnten, jedoch diese sicherlich nicht als richtig anzusehen waren, da sich in fast allen Fällen bei Vergleich von Verdünnungen und korrespondierenden, abgelesenen ACTH-Konzentrationen ein vollkommen inadäquater Konzentrationsabfall oder aber wieder ein paradoxes Ansteigen der abgelesenen Konzentration bei gleichzeitiger Verdünnung des Serums ergab.

Nach diesen Ergebnissen ist es uns also nicht möglich, ACTH direkt im Serum zu messen. Auch mit dem Antiserum "Marseille" war dies nicht möglich, obwohl in der Literatur die direkte Messung mit diesem Antiserum beschrieben ist (44). Daß wir das uns überlassene Antiserum mit einem cirka eine Zehnerpotenz niedrigeren Titer einsetzen mußten, mag teilweise als Erklärung dafür dienen. Allerdings wurde von derselben Arbeitsgruppe Jahre später ebenfalls für denselben ACTH-RIA eine vorherige Extraktion des ACTH aus dem Plasma vorgeschlagen und publiziert (43a). Die erzielte Empfindlichkeit entsprach etwa den Erwartungen, die man aufgrund der Literatur haben durfte. Wir stießen jedoch bei unseren direkten Bestimmungsversuchen auf unüberwindliche Probleme, die nicht dem Antiserum anzulasten waren, sondern beim jeweils zu bestimmenden Serum liegen dürften. Unsere Versuche weisen letztlich darauf hin, daß in vielen Seren eine bisher unbekannte Komponente die direkte Bestimmung des adrenocorticotropen Hormons stört und zu falsch niedrigen bzw. bei Verdünnung zu höheren

Ergebnissen führt. Man spricht von möglichen Kreuzreaktionen verschiedener Hormonbruchstücke (3, 4, 44, 56) oder von einem "Faktor" (13, 22, 37, 47, 49), der ACTH ähnlich einer Proteinbindung im Serum binden soll, und bezieht sich dabei auf ein kürzlich gefundenes Protein für die neurohypophysären Hormone (Neurophysin) (7, 13, 24).

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten wird häufig die direkte Bestimmung durch einen vorge-schalteten Extraktionsschritt umgangen (8, 10, 20, 49). Dieser Arbeitsgang ist zwar technisch aufwendiger, erscheint jedoch schließlich auch uns unvermeidbar, wenn man das "wahre" ACTH im Serum exakt bestimmen will.

Sicherlich werden auch weiterhin die Bemühungen um geeignete ACTH-spezifische Antiseren, die eventuell eine Extraktion überflüssig machen könnten, fortgesetzt werden (Dissertation Madler, in Vorbereitung). Auch stellt sich die Frage nach der Aufklärung störender Einflüsse im Serum (s. oben).

Sollten diese Probleme gelöst werden können, wäre der Zeitpunkt einer routinemäßig durchführbaren exakten Bestimmung des adrenocorticotropen Hormons gekommen.

Das Problem einer optimalen Extraktionsmethode war aber nicht Thema und Inhalt dieser Dissertation und wird von anderen bearbeitet (M. Madler, R. Fink, Dissertationen in Vorbereitung).

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war der Aufbau einer radioimmunologischen ACTH-Bestimmungsmethode im Plasma: Es gelang, das Prinzip einer Doppelantikörper-Trennungsmethode bei diesem Assay anzuwenden. Dies erbrachte gute Ergebnisse bezüglich der unteren Nachweisgrenze (von 9,5 pg/ml oder 3,3 pg/Ansatz), Streubreite der Dreifachwerte und der relativ geringen unspezifischen Bindung. Außerdem bietet diese Methode prinzipiell die Möglichkeit zur Automatisierung einer eventuellen Routinebestimmung an unserer Klinik, da die TSH-Bestimmung im Routineprogramm schon nach diesem Methodenprinzip arbeitet.

Weiterhin konnten wir durch radiochromatographische Untersuchungen beweisen, daß unsere Tracerreinigungsmethode mit Quso Jodid und "Damage" ausreichend vom markierten ¹²⁵J-ACTH (Tracer) trennt.

Durch eintägige Vorinkubation konnte die Empfindlichkeit des Assays gesteigert werden. Außerdem konnten wir nachweisen, daß die vielfach beschriebene Inkubationszeit von 6 Tagen für Tracer und ACTH-Antikörper auf 16 Stunden verkürzt werden kann, weswegen unser Assay wesentlich zeitsparender ist.

Wir stellten eigene Antiseren bei Kaninchen her, wobei wir befriedigende Bindungsverhältnisse zwischen

Tracer und Antiseren bei Titern von 1:1000 und höher erzielten. Leider ergab sich jedoch eine schlechte Verdrängbarkeit aus dieser Bindung durch kaltes ACTH, was eine Verwendung für Standardkurven unmöglich machte.

Bei unseren Messungen mit Patientenseren von bekannt hohem ACTH-Spiegel konnten wir teils durch Serumverdünnungskurven bestätigte richtige Werte messen, teils jedoch sicher falsche, da die entsprechenden Serumverdünnungskurven nicht mit der Standardkurve übereinstimmten und einige Seren sogar in ihren Bindungsraten über den B_0 -Werten lagen.

Bei Messungen an Normalpersonen konnten zwar ebenfalls die etwa zu erwartenden Konzentrationen gemessen werden, jedoch ergab sich bei Verdünnungen in den meisten Fällen ein ungenügender Abfall der gemessenen Konzentrationen oder aber sogar ein paradox scheinbarer Anstieg der Meßwerte.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen ist eine direkte Bestimmung des ACTH im Plasma vorerst nicht möglich. Es wird also nötig sein, unserem Radioimmunoassay eine geeignete Extraktionsmethode vorausgehen zu lassen, um das "wahre ACTH" messen zu können. Dies war jedoch nicht die Aufgabe der vorliegenden Dissertation.

6. LITERATUR

1. AUBERT, M. L., J. P. FELBER:
Studies on ACTH-binding antibodies:
Characterisation of immunological specificities.
Acta endocr. 62, 521 (1969)
2. BAUR, X.:
Zur Problematik der biologischen ACTH-Bestimmung in vivo und in vitro.
Inauguraldissertation, Universität München (1974)
3. BERSON, S. A. and R. S. YALOW:
Radioimmunoassay of ACTH in Plasma.
J. Clin. Invest. 47, 2725 (1968)
4. BERSON, S. A. and R. S. YALOW:
Introduction to the Symposium on Radioimmunoassay: General principles.
Eds.: J. P. Felber and J. J. Scheidegger.
S. Karger, Basel, Vol. 3, 89 (1970)
5. BESSER, G. M., D. N. ORTH, W. E. NICHOLSON, R. L. BYNY, K. ABE and J. P. WOODHAM:
Dissociation of the disappearance of bioactive and radioimmunoreactive ACTH from Plasma in Man.
J. Clin. Endocrin. 32, 595 (1971)
6. CAMPBELL, R. C.:
Statistische Methoden für Biologie und Medizin
Georg Thieme Verl. Stuttgart (1971)
7. CHENG, K. W. and H. G. FRIESEN:
A Radioimmunoassay for vasopressin binding proteins - neurophysin.
Endocrinology 88, 608 (1971)

8. DEMURA, H., C. D. WEST, C. A. NUGENT, C. A. NAKAGAWA and F. H. TAYLOR:
A sensitive radioimmunoassay for plasma ACTH levels.
J. Clin. Endocr. 26, 1297 (1966)
9. DIEM, K. und C. LENTNER:
Wissenschaftliche Tabellen
Documenta Geigy 7. Aufl. Basel (1968)
10. DONALD, R. A.:
A rapid method for extracting corticotrophin from plasma.
J. Endocr. 39, 451 (1967)
11. DONALD, R. A.:
Plasma immunoreactive corticotrophin and cortisol response to insulin-hypoglycemia in normal subjects and patients with pituitary disease.
J. Clin. Endocr. 32, 225 (1971)
12. ERHARDT, F., I. MARSCHNER, R. C. PICKARDT und P. C. SCRIBA:
Verbesserung und Qualitätskontrolle der radioimmunologischen Thyreotropin-Bestimmung
Z. Klin. Chem. klin. Biochem. 11, 381 (1973)
13. FEHM, H. L., K. H. VOIGT, R. LANG, M. B. ÖZYOL and E. F. PFEIFFER:
Problems and artefacts in ACTH-assay.
Horm. Metab. Res. 4, 477 (1972)
14. GEWIRTZ, G., B. SCHNEIDER, D. T. KRIEGER, and R. S. YALOW:
Big ACTH: Conversion to biologically active ACTH by Trypsin.
J. Clin. Endocrin. Metab. 38, 227 (1974)

15. GREENSPAN, R., C. H. LI and M. EVANS:
Disappearance rate of ACTH from rat's
plasma after i.v. injection.
Endocr. 46, 261 (1950)
16. GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER and G. S. GLOVER:
The preparation of ¹³¹I-labelled human
growth hormone of high specific radio-
activity.
Biochem. J. 89, 114 (1963)
17. HACKER, R.:
Biologische Bestimmung der ACTH-Aktivität
im menschlichen Plasma.
Inauguraldissertation, Universität München
(1966)
18. HOLDAWAY, I. M., R. LESLEY, H. REES and J. LONDON:
Circulating corticotrophin levels in severe
hypopituitarism and in the neonate.
Lancet: 24, 1170 (1973)
19. HUNTER, W. M. and F. C. GREENWOOD:
Preparation of Jodine-131 labelled human
growth hormone of high specific activity.
Nature 194, 495 (1962)
20. LONDON, J. and F. C. GREENWOOD:
Homologous radioimmunoassay for plasma
levels of corticotrophin in man.
Lancet: 1, 273 (1968)
21. LONDON, J., F. C. GREENWOOD and J. GIRARD:
The specificity of a radioimmunoassay for
human plasma ACTH. Protein and Polypeptid-
hormon.
Ed. M. Margoulies Int. congr. series 161
(1968)

22. LANDAU, B.:
An adrenocorticotrophin-inhibiting substance in the plasma of hypophysectomized rats.
J. Endocr. 47, 389 (1970)
23. LAURANT, F. C. and R. KILLANDER:
The theory of gel filtration and its experimental verification.
J. Chromatogr. 14, 1317 (1964)
24. LEGROS, J. J. and P. FRANCHIMONT:
Human neurophysine blood levels under normal, experimental and pathological conditions.
Clin. Endocrin. 1, 99 (1972)
25. LEIDENSBERGER, F., R. WILLASCHEK and V. PAHNKE:
Applications of a radioligand receptor assay for the determination of luteinizing hormone in human serum.
Acta endocr. Suppl. 193, 127 (1975)
26. MARSCHNER, I., F. ERHARDT and P. C. SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay-standard-curve by "spline function".
Radioimmunoassay and related procedures in Medicine, Vol. I, p. 111, Intern. Atomic Energy Agency, Vienna (1974)
27. MARSCHNER, I., F. ERHARDT, HENNER and P. C. SCRIBA:
A modular analyzer system for double antibody radioimmunoassays.
Z. klin. Chem. Biochem. 13, 481 (1975)
28. MATSUKURA, S., C. D. WEST, W. JUBIZ, G. HARADA and F. H. TAYLER:
A new phenomenon on of usefulness in the radioimmunoassay of plasma adrenocorticotrophic hormone.
J. Lab. Clin. Med. 77, 491 (1971)

29. MEAKIN, J. W., W. H. TRUGEY jr. and D. H. NELSON:
The catabolism of adrenocorticotrophic hormone: The stability of adrenocorticotrophic hormone in blood, plasma, serum and saline.
Endocr. 66, 59 (1960)
30. MELICK, A., M. AURBACH, R. POTTS:
Distribution and half-life of ¹³¹-J-labelled parathyroid hormone in the rat.
Endocr. 77, 198 (1965)
31. MÜLLER, O. A., X. BRAUN, I. MARSCHNER, P. SCHWANDT, P. C. SCRIBA and P. WEISWEILER:
ACTH-bioassay with isolated rat cells. ACTH-activity of the porcine lipotropic peptide B.
Acta endocr. Suppl. 184, 164 (1974)
32. NAHRS, P. W., M. STAHL, M. DAMBACHER, J. BAUMANN and J. GIRARD:
On the use of a peptidase inhibitor (Trasylol) für storage of J-125-labelled peptide hormone.
Experientia 28, 213 (1972)
33. NELSON, D. H., J. W. MEAKIN, J. B. DEALY jr., D. D. MATSON, K. EMERSON jr. and G. W. THORN:
ACTH-producing tumor of the pituitary gland
N.Engl.J.Med. 259, 161 (1958)
34. NIESCHLAG, E. and LORIAUX:
Radioimmunoassay for plasma testosterone
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 10, 164 (1972)
35. ORTH, D. N.:
Methods of hormone radioimmunoassay
Eds.: B. M. Jaffe, H. R. Behrmann 125 (1974)

36. PFEIFFER, E. F., W. E. VAUBEL, K. RETIENE,
D. BERG and H. DITSCHUNEIT:
Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten
im nativen Plasma des Menschen
Erg.Inn.Med. N.F. 20, 127 (1963)
37. PINCUS, G., T. F. HOPKINS and O. HECHTER:
An ACTH-inactivating factor in mammalian
blood.
Arch. Biochem. 37, 408 (1952)
38. RETIENNE, K., M. FISCHER, H. DITSCHUNEIT und
E. F. PFEIFFER:
Biologische Halbwertszeit von exogenem
ACTH im menschlichen Blut.
9. Symposium Dt.Ges.Endokrin.Springer-
Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
39. RICHARD, L. and G. SAYERS:
Fate and excretion of adrenocorticotropic
hormone.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 77, 87 (1951)
40. RUF, K.:
Bestimmungsmethoden für ACTH beim Menschen.
Schw.Med.Wschr. 96, 684 (1966)
41. SAYERS, G. and N. D. GIORDANO:
Adrenal ascorbic acid depletion and iso-
lated rat adrenal cell methods.
Methods in Invest. and Diagn. Endocr. 2A
359 (1973)
Eds.: Berson and Yalow, North Holland
Publishing Comp.
42. SAYERS, G., R. L. SWALLOW, and N. D. GIORDANO:
An improved technique for the preparation
of isolated rat adrenal cells:
A sensitive, accurate and specific method
for the assay of ACTH.
Endocrin. 88, 1063 (1971)

43. SIEGEL, L. M. and K. J. MONTY:
Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases.
Biochem.Biophys.Acta 112, 346 (1966)
- 43a. USATEGUI, R., Ch. OLIVER, H. VAUDRY, G. LOMBARDI, I. ROZENBERG and A. M. MOURRE:
Immunoreactive α -MSH and ACTH Levels in Rat Plasma and Pituitary.
Endocrinology 88, 189 (1976)
44. VAGUE, Ph., Ch. OLIVER, Ph. JAQUET et J. VAGUE:
Le dosage radioimmun-logique de l'ACTH plasmatique.
Resultats chez les sujets normaux.
Rev.Europ.Etudes Clin. et Biol. 16, 485 (1971)
45. VAITUKAITIS, J., J. B. ROBBINS, E. NIESCHLAG and G. T. ROSS:

J.Clin.Endocr.Metab. 33, 988 (1971)
46. VIRASORO, E., G. COPINSCHI, O. D. BRUNO:
Degradation of labelled Hormone in Radio-immunoassay of ACTH.
Radioimm.relat.proced.Med.Vol.I., p.323,
Intern.Atomic Energy Agency, Vienna (1974)
47. VOIGT, K. H., H. L. FEHM, and E. F. PFEIFFER:
Evidence for an "ACTH binding factor" in plasma.
Hormon.Metab.Res. 3, 227 (1971)
48. VOIGT, K. H., H. L. FEHM and E.F.PFEIFFER:
Production of antibodies to ACTH for -se in radioimmunoassay.
Hrom.Metab.Res. 5, 313 (1971)

49. VOIGT, K. H., H. L. FEHM, R. RECK and E. F. PFEIFFER:
Spontaneous and stimulated secretion of Quoso-extractable, immunoassayable ACTH in man.
Klin. Wschr. 52, 516 (1974)
50. v. WERDER, K., K. SCHWARZ and P. C. SCRIBA:
Serumproteinbindung von ACTH. Erste Untersuchungen mit Dextrangelfiltration und 3H-ACTH.
Klin. Wschr. 46, 940 (1968)
51. WINTERS, A. J., Ch. OLIVER, Ch. COLSTON, P. G. MAC DONALD and J. C. PORTER:
Plasma ACTH levels in the human fetus and neonate as related to age and Parturition.
J. Clin. Endocr. Metab. 39, 269 (1974)
52. WOLF, MEDLOWITZ, SOFFERS, ROBOZ and GILTAR:
Metabolism of Corticotropin in man.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 244 (1965)
53. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Characteristics of "Big ACTH" in human plasma and pituitary extracts.
J. Clin. Endocr. Metab. 36, 415 (1973)
54. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Plasma ACTH in man.
Radioimmunoassay, Hospital Medicine, publications limited (1971)
55. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Radioimmunoassay Methods application to different peptide hormones.
Hormones, Lipids and Miscellaneous 3, 108 Karger Basel (1970)
56. YALOW, R. S.:
Heterogeneity of peptide hormones: its implications for radioimmunoassay.
Symposium on radioimmunoassay and related procedures in clinical medicine and research - Istanbul Turkey SM-177 (1973)

57. YALOW, R. S. and S. A. BERSON:
Immunoassay of endogenous plasma insulin
in man.
J. Clin. Med. 39, 1158 (1960)
58. YALOW, R. S. and A. S. BERSON:
Topics on radioimmunoassay of peptide
hormones. Protein and Polypeptidhormones.
Ed.: M. Margonlies, Excerpt Medica 161
(1968)

LEBENS LAUF

16. 1. 1949 geboren als Sohn des am 3.12.1964
verstorbenen Mundartschriftstellers
Michl Ehbauer und seiner Frau Katharina
geb. Hartl in München
- ab 1955 4 Jahre Volksschule in der Stielerschule
in München
- ab 1959 Humanistisches Theresiengymnasium München
23. 7. 1968 Abitur
- 1968 - 1970 Praktikum der Pharmazie und Abschluß mit
dem Vorexamen
- 1970 - 1971 zwei Semester Diplomchemie
- 1971 - 1976 Studium der Humanmedizin an der Universi-
tät München
Während des Studiums arbeitete ich mit
Unterbrechungen von Herbst
- 1973 - 1975 am experimentellen Teil dieser Dissertation
in den Laboratorien für experimentelle
Endokrinologie der Medizinischen Klinik
Innenstadt
30. 7. 1976 Ärztliche Prüfung.
Anschließend war ich als Medizinalassistent
tätig und erhielt am
10. 1. 1978 die Approbation. Seit dem
1. 3. 1978 bin ich als Verwalter der Dienstgeschäfte
eines wissenschaftlichen Assistenten an
der I. Medizinischen Klinik im Klinikum
Großhadern der Universität München tätig.
Meine Frau Denise, geb. Germanos, von
Beruf klinische Psychologin, und ich haben
zwei Kinder.

